UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DES SCIENCES

Institut de biologie et de physiologie végétales
Directeur : Professeur P.-E. Pilet

Catabolisme auxinique de cellules d'Erable cultivées «in vitro»

Thèse

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne
en vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences
par

FRANÇOIS MAILLARD

Epalinges
Imprimerie La Concorde
1976

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DES SCIENCES

Institut de biologie et de physiologie végétales
Directeur : Professeur P.-E. Pilet

Catabolisme auxinique de cellules d'Erable cultivées «in vitro»

Thèse

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne
en vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences
par

FRANÇOIS MAILLARD

Epalinges
Imprimerie La Concorde
1976

Imprimatur

Université de Lausanne
Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

MM les Professeurs J.-P. Zryd, directeur de thèse, P.-E. Pilet, expert, et G. Brunisholz, président du jury,

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

M. François Maillard, licencié ès sciences naturelles (diplôme d'Etat)

intitulée "Catabolisme auxinique de cellules d'érable cultivées "in vitro"

Lausanne, le 6 mai 1976

pour *Le doyen de la Faculté des Sciences:*
Georges Brunisholz, vice-doyen

UNIV. LEIDEN BIBL.

TABLE DES MATIERES.

Tableau des abréviations. VII

Avant-propos. IX

Chapitre 1. LE PROBLEME. p. 1

Chapitre 2. MATERIEL.

2.1. Historique de la culture d' Acer pseudoplatanus. p. 9

2.2. Méthodes de culture p. 11

2.2.1. Le milieu p. 11

2.2.2. Culture en milieu gélosé p. 13

2.2.3. Culture en milieu liquide (suspension cellulaire) p. 14

2.2.4. Etalement sur plaque de gélose (plating) p. 16

2.3. Traitement mutagène et sélection des mutants. p. 19

2.4. Caractéristiques des mutants p. 21

2.5. Croissance d'une suspension cellulaire p. 22

2.6. Contrôle de la culture en suspension p. 27

Chapitre 3. TECHNIQUES.

3.1. Activité auxines-oxydasique p. 31

3.1.1. Avant-propos p. 31

3.1.2. Activité auxines-oxydasique "in vitro" p. 31

3.1.2.1. Principe p. 31

3.1.2.2. Préparation de l'extrait p. 32

3.1.2.3. Purification de l'extrait par filtration sur gel p. 34

3.1.2.4. Dosage de l'activité AIA-ox p. 38

a) - par dosage de l' AIA dégradé p. 39

b) - par spectrophotométrie des produits de dégradation de l' AIA p. 40

3.1.3. Activité auxines-oxydasique "in vivo" p. 44

3.1.3.1. Principe p. 44

3.1.3.2. Incubation p. 46

3.1.3.3. Comptage du CO_2 radioactif dégagé p. 47

3.2. Analyse des composés indoliques formés

3.2.1. Incubation p. 47

3.2.2. Extraction des composés indoliques p. 48

3.2.3. Chromatographie sur couche mince p. 51

3.2.4. Evaluation de la radioactivité sur le chromatogramme p. 54

3.3. Localisation du complexe auxines-oxydasique.

3.3.1. Préparation de protoplastes d'Acer p. 56

3.3.2. Incubation p. 57

3.3.3. Dosage de l'activité de décarboxylation p. 58

3.4. Chromatographie en phase gazeuse (GC) d'un extrait purifié de composés indoliques. p. 59

Chapitre 4. RESULTATS.

4.1. Inventaire des problèmes p. 61

4.1.1. Teneur en AIA endogène p. 61

4.1.2. Activité auxines-oxydasique p. 61

4.1.3. Produits conjugués de l'AIA p. 62

4.1.4. Localisation du complexe auxines-oxydasique p. 62

4.2. Teneur en AIA endogène.

4.2.1. Avant-propos p. 63

4.2.2. Méthode p. 67

4.2.3. Résultats p. 72

4.2.4. Observations p. 74

4.3. Activité auxines-oxydasique

4.3.1. Activité AIA-ox "in vitro" p. 75

4.3.1.1. Avant-propos p. 75

4.3.1.2. Problèmes méthodologiques p. 77

4.3.1.3. Résultats p. 79

4.3.1.4. Effet de la lyophilisation p. 86

4.3.1.5. Cinétique des AIA-ox en fonction de la concentration en substrat et en différents cofacteurs. p. 91

a) AIA
b) Acide p-coumarique
c) $MnCl_2$

4.3.1.6. Observations. p. 97

4.3.2. Activité AIA-ox "in vivo"

4.3.2.1. Avant-propos p. 98

4.3.2.2. Résultats (décarboxylation) p. 100

4.3.2.3. Observations p. 102

4.3.3. Produits de dégradation de l'AIA*

4.3.3.1. Avant-propos p. 103

4.3.3.2. Résultats AIA-1-^{14}C p. 107

4.3.3.3. Résultats AIA-2-^{14}C p. 112

4.3.3.4. Etude des produits de dégradation dans le milieu d'incubation p. 116

4.3.3.5. Observations p. 118

4.4. Produits conjugués de l' AIA.

4.4.1. Existence de produits conjugués p. 121

4.4.1.1. Avant-propos p. 121

4.4.1.2. Résultats p. 122

4.4.1.3. Observations p. 127

4.4.2. Cinétique de formation des produits conjugués.

4.4.2.1. Avant-propos p. 128

4.4.2.2. Résultats selon la méthode (1) (AIA*présent en continu dans le milieu d'incubation) p. 130

4.4.2.3. Résultats selon la méthode (2) ("pulse-chase") p. 133

4.4.2.4. Observations p. 140

4.4.3. Identification du sucre présent dans le glucoside d' AIA.

4.4.3.1. Avant-propos p. 145

4.4.3.2. Méthode p. 146

4.4.3.3. Résultats p. 149

4.4.3.4. Observations p. 153

4.5. Localisation du complexe auxines-oxydasique

4.5.1. Avant-propos p. 154

4.5.2. Résultats p. 156

4.5.3. Observations p. 158

4.6. Discussion de quelques résultats p. 160

Chapitre 5. CONCLUSIONS GENERALES. p. 165

Chapitre 6. BIBLIOGRAPHIE. p. 169

LISTE DES ABREVIATIONS.

ACPC	acide p-coumarique
AIA	acide β -indolyl-acétique
AIA-glu	conjugué de l' AIA à un glucoside
AIA-ox	système auxines-oxydasique
cell/ml	nombre de cellules par millilitre
cpm	coups par minute
µCi	microcurie
DCP	2,4-dichlorophénol
DO	densité optique
dpm	désintégrations par minute
2,4-D	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
EDTA	éthylène-diamine-tétraacétate
GC	Chromatographie en phase gazeuse
IAAsp	β -indolyl-acétylaspartate
IAAm	β -indolyl-acétamide
IC	indice colorimétrique
M	molaire
MS	spectrométrie de masse
N	normal
nb	nombre
nm	nanomètre
nmoles	nanomoles
PCV	"packed cell volume" = volume cellulaire sédimenté
PF	poids frais
PM	poids moléculaire
PS	poids sec
Rf	"retardation factor"
St	standard
TE	témoin
TLC	chromatographie sur couche mince
UV	ultra-violet

AVANT - PROPOS.

" L' homme se conduit comme s'il devait parvenir à une connaissance absolue, et le pourquoi incessant qu'il adresse à la nature en est la preuve. C'est en effet cet espoir constamment déçu, constamment renaissant, qui soutient et soutiendra toujours les générations successives dans leur ardeur passionnée à rechercher la vérité."

Claude Bernard.

L'étude de la croissance des organismes a très tôt préoccupé les biologistes, celle-ci constituant un des phénomènes les plus spectaculaires de la vie.

La démarche intellectuelle du scientifique étant toujours de rechercher la plus petite partie d'un individu capable de réaliser le phénomène observé, les biologistes se sont très vite aperçus que la cellule représentait une telle entité. L'étude de la structure et de la physiologie cellulaire a, par conséquent, dominé dans la Biologie moderne.

Cependant, les organismes vivants étant formés de différents types de tissus, constitués chacun de cellules identiques accomplissant une fonction hautement spécialisée, il était intéressant de connaître le comportement d'un ensemble de cellules semblables, privé de ses relations avec les tissus voisins.

Cette idée fut le point de départ de la culture de tissus.

Celle-ci se développa très rapidement pour les tissus animaux, mais resta presque toujours limitée à des études cytologiques, le nombre de cellules pouvant être obtenues par cette technique étant restreint.

La culture de tissus végétaux se heurta, à ses débuts, à d'innombrables difficultés, notamment dans l'élaboration d'un milieu de culture. Par la suite, elle connut un essor de plus en plus grand, dû à sa capacité de produire de grandes masses cellulaires. pouvant être cultivées durant de longues périodes, voire même indéfiniment (Gautheret 1939). Les chercheurs comprirent assez vite l'importance des cultures de tissus végétaux pour l'étude de paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les exigences nutritionnelles des cultures furent très largement étudiées, dans le but de remplacer les milieux primitifs à base d'extraits biologiques (lait de coco, jus de tomate, etc...) par des milieux entièrement synthétiques, et par conséquent totalement contrôlables.

A ce propos, l'intervention de l'acide β -indolyl-acétique dans la prolifération cellulaire a très tôt été reconnue, soit en tant que composé endogène synthétisé par la culture, soit comme substance exogène, fournie dans le Milieu.

Mais le problème se compliqua lorsqu'on s'aperçut que certaines cultures d'origine tumorale (crown-gall) étaient capables de croître sur un milieu dépourvu d'auxines. Dans ce type de culture, dont la teneur en auxine endogène est élevée, on ne peut pas affirmer que la croissance est assurée grâce à cette hormone. En effet, il est très possible que ces tissus soient capables de se passer d'auxines.

Le problème de l'indépendance à l'auxine de certaines cultures était posé, et c'est dans ce domaine que les Professeurs Pilet et Zrÿd me proposèrent alors de travailler.

Je voudrais exprimer ma sincère reconnaissance au Professeur Paul-Emile Pilet, directeur de l' Institut de Biologie et de Physiologie Végétales. Son intérêt constant et bienveillant m'a permis de mener à bien mes recherches. Les qualités humaines du Professeur Pilet, son enseignement, la grande liberté qu'il m'a toujours accordée au sein de son Institut, ses conseils aussi ont été précieux et stimulants durant ces sept années au cours desquelles j'ai préparé ma thèse. Je tiens encore et tout particulièrement à le remercier pour son efficace participation à la préparation du manuscrit de cette thèse.

Je voudrais dire aussi, et dans la même mesure, ma gratitude au Professeur Jean-Pierre Zrÿd, directeur de thèse, qui m'a initié à la délicate technique des cultures de cellules végétales. Par son objectivité et ses compétences, il a stimulé mon goût pour la recherche. A l'occasion des nombreux entretiens qu'il m'a toujours accordés volontiers, j'ai su apprécier son ouverture aux divers problèmes que pose la recherche. Pour tout ce qu'il a fait pour moi, je le remercie amicalement.

Malgré leurs propres préoccupations, mes collègues de l' Institut ont toujours été prêts à m'aider de leurs conseils et de leurs connaissances. J'ai pu apprécier à leur contact toute la valeur de la camaraderie et de l'esprit d'équipe. Je leur témoigne à tous ma sincère amitié et à Laurent Rivier, en particulier, qui a bien voulu se charger des analyses en GC et en GC-MS.

Je dois également beaucoup au personnel technique qui, par son dévouement, a contribué à la réalisation pratique de ce travail, et à Monsieur Magliocco, chef-préparateur, qui m'a toujours fait bénéficier de ses compétences professionnelles.

Chapitre 1

LE PROBLEME

Le phénomène de l'indépendance à l'auxine a été observé très tôt par les auteurs travaillant avec des cultures de tissus végétaux. On peut distinguer deux types de tissus indépendants :

A. Les tissus anergiés
B. Les tissus tumoraux.

A. - Tissus anergiés.

Certains tissus cultivés sur un milieu contenant de l'auxine peuvent occasionnellement développer, à la suite de plusieurs repiquages, des parties dont la croissance est indépendante de la présence d'auxine dans le milieu. Ce phénomène, mis en évidence dans des cultures de Scorsonères (Gautheret 1946) a reçu le nom d'anergie ou d'accoutumance à l'auxine, alors que les auteurs anglo-saxons utilisent de préférence le terme d' "habituation". Par la suite, des observations similaires furent faites sur d'autres espèces végétales en culture, notamment par Morel (1947) dans des tissus de Vigne et Kandler (1952) sur le Soleil.

Ces tissus contiennent en général des concentrations élevées d'auxines (Kulescha et Gautheret 1948, Kulescha 1952).

L'établissement du phénomène d'anergie comprend tous les stades entre la dépendance et l'indépendance complète à l'auxine (Morel et Gautheret 1955).

Les mécanismes de l'anergie sont encore fort mal connus. Gautheret ne pense pas qu'il soit dû à des mutations spontanées, mais plutôt à une adaptation enzymatique. D'autres auteurs suggèrent un type de mutation somatique affectant le système de régulation de l'auxine (Kandler 1952, White 1951).

Les cultures anergiées sont remarquables par la similitude de leurs propriétés avec les souches établies de Crown-gall ou de tumeurs génétiques que nous définirons plus loin.

Greffées sur des plantes saines, elles déterminent une tumeur à l'endroit de la greffe (Limasset et Gautheret 1950).

Elles furent souvent utilisées comme référence dans les études des problèmes concernant le crown-gall, précisément à cause de leur faculté de croître sans auxines.

B. - Tissus tumoraux.

On peut distinguer trois principaux types de tumeurs végétales :

a) les crown-galls ou tumeurs bactériennes
b) les tumeurs virales
c) les tumeurs génétiques.

a) Tumeurs bactériennes ou crown-galls.

Le crown-gall est un type de cancer végétal induit par la pénétration dans une plante-hôte à la suite d'un traumatisme, d'une bactérie du sol : l' Agrobacterium tumefaciens.

Trois étapes successives conduisent à la formation du crown-gall :

- une première étape de conditionnement, durant laquelle la plante réagit au traumatisme.

- la seconde étape, ou période d'induction, concerne l'initiation d'une cellule conditionnée, en présence de l'inducteur. Cette étape est de courte durée.

- la troisième étape est celle de la prolifération de l'initiale tumorale. Elle est indépendante de la présence de l' Agrobacterium. Cette masse cellulaire peut être cultivée indéfiniment, "in vitro". Ce type de cellules est complètement indépendant des mécanismes de contrôle de l' hôte.

L'existence d'une blessure semble indispensable à la formation d'une tumeur. Des bactéries infiltrées sous vide dans des feuilles de Bryophyllum, sans causer de blessure, ne provoquent pas de tumeur (Rack 1953).

Au cours de la phase d'induction, les bactéries restent toujours localisées dans les espaces intercellulaires, d'où elles émettent un "principe inducteur de tumeur" (PIT) qui rend la cellule-cible tumorale. La durée minimale de cette phase est de 10 h à 25° C.

Bien que l' Agrobacterium soit capable de synthétiser de l'acide β-indolyl-acétique à partir de tryptophane (Berthelot et Amoureux 1938), on n'a pas pu trouver de corrélation entre cette auxine et la transformation tumorale (Locke et al. 1939). Le taux élevé en auxine nécessaire à l'induction tumorale serait causé par une inhibition des auxines-oxydases plutôt que par un apport de la bactérie.

La teneur en azote protéinique, l'intensité du métabolisme respiratoire et l'activité des oxydases ne sont pas différents dans les tissus normaux et tumoraux.

Une des principales caractéristiques des tissus de crown-gall est leur teneur en eau élevée et les importantes modifications de leur métabolisme azoté. Certains acides aminés particuliers ne sont synthétisés que par les crown-gall , notamment la lysopine (80 % des acides aminés solubles) (Lioret 1963, 1966), l'octopine et l'acide octopinique (Menage et Morel 1964, 1965a, 1965b).

Une des propriétés les plus fondamentales des tissus tumoraux, dont l'étude fait l'objet de notre travail de thèse, est leur indépendance aux auxines. Leur insensibilité est presque totale aux effets excito-formateurs de ces substances (Cziharz et Brücker 1962, Hildebrandt et Riker 1947, De Roop 1947). Dans certaines conditions, les tissus végétaux réagissent tout de même aux auxines : les cellules tumorales par exemple modifient leur forme - sans que leur prolifération change - sous leur action. La teneur élevée en auxines des tissus tumoraux serait due à son accumulation à titre de déchet, cette substance n'étant pas un facteur de leur multiplication.

Cependant, Kulescha a montré que l'auxine était un facteur de prolifération pour les deux types de tissus, sain et tumoral, en inhibant l'utilisation de celle-ci par l' hydrazide maléique. Dans les deux cas, l'auxine synthétisée s'accumule dans le tissu. En greffant un fragment de tissu tumoral sur un tissu sain, ce dernier est capable de croître dans un milieu dépourvu de toute hormone de croissance. Il n'est cependant pas transformé en tissu indépendant car, repiqué sur le même milieu, sans greffage, il ne se multiplie pas. On peut en déduire que le tissu tumoral est capable de fournir au tissu sain les deux hormones nécessaires à sa croissance, l'auxine et la kinétine (Kulescha 1953, 1954).

b) Tumeurs virales.

Le seul type de tumeur virale étudié est celui résultant de l'invasion d'une plante-hôte par un virus de l' espèce Aureogenus magnivena Black, à la suite d'un traumatisme. On les désigne généralement par le terme de "tumeurs de blessure" (Black 1944).

Des cultures de ce type particulier de tissu ont pu être réalisées à partir de la racine infectée d' Oseille (Black 1944, 1957). Ces tissus pouvaient être cultivés sur le milieu de White, alors que les souches isolées d'une racine saine étaient incapables de croître sur un tel milieu. L'apport de sucres est indispensable, ainsi qu'une concen - tration élevée en phosphate (Nickell 1955).

Alors qu'au début de la culture, le virus se multiplie dans les cellules, celui-ci disparait ensuite complètement au cours des repiquages successifs, et la culture devient stérile. Si, à ce moment, cette culture est greffée sur une plante saine, elle y détermine la formation d'une tumeur. La culture stérile a donc conservé son pouvoir tumorigène.

c) Tumeurs génétiques.

Ce type de tumeurs apparait spontanément lors de croisements interspécifiques de certains genres, en particulier Nicotiana, sans intervention d'un agent oncogène extérieur.

White (1944) réalisa la mise en culture "in vitro" de tissus de tumeurs génétiques du Nicotiana glauca x N. langsdorfii. Ces cultures, maintenues sur milieu de White, ne nécessitent pas d'apport exogène d'auxine ou d'autres facteurs de croissance. Elles possèdent toutes une teneur élevée en auxine.

Après 5 ans de culture, ces tissus provoquaient encore des tumeurs lorsqu'ils étaient greffés sur une plante saine. Le pouvoir tumorigène était donc maintenu par la culture.

L'indépendance des tissus tumoraux semble donc être dû, au moins pour une part, à un accroissement de leur capacité de synthèse de l'auxine. Meins (1975) a montré, sur des crown-galls de Tabac, que l'autotrophie dépendait de la température. Des cultures indépendantes à 25° C devenaient dépendantes de l' ANA ou du 2,4-D si elles étaient cultivées à 35° C. L'auteur propose d'expliquer ce phénomène par une modification du phénotype due à la température.

Le matériel végétal utilisé dans notre travail est un variant phénotypique autotrophe pour les auxines apparu dans des cultures cellulaires d' Acer soumises à un traitement mutagène (Lescure 1970a). Cette souche constitue un cas inédit de culture indépendante et on pourrait la considérer comme un nouveau type de tissu tumoral, ou, plus précisément, comme une souche artificiellement anergiée.

Ce matériel était donc très intéressant dans le contexte de l'étude des relations existant entre la croissance et les phyto-hormones.

Le fait que l'on puisse cultiver la souche normale et la souche indépendante sur le même milieu de base (ce qui, rappelons-le n'est pas le cas du crown-gall) présente un avantage méthodologique.

L'incubation d'un cal avec une phytohormone pose généralement des problèmes considérables, notamment en ce qui concerne la pénétration. En effet, le cal étant une masse cellulaire compacte, l'hormone peut pénétrer aisément dans les cellules périphériques, mais n'atteint les cellules sous-jacentes que plus difficilement. Il s'ensuit que le traitement n'est pas du tout homogène.

Les tissus d' Erable pouvant être cultivés en milieu liquide sous forme de suspensions cellulaires, les problèmes de pénétration et d'homogénéité du traitement étaient résolus, chaque cellule étant en contact avec le milieu d'incubation par toute sa surface.

Nous avons d'emblée choisi d'aborder le problème de l'indépendance sous l'angle du catabolisme auxinique, et plus précisément du devenir métabolique de l'acide β-indolyl-acétique (AIA). Un certain nombre d'arguments étaient en faveur de cette option. Tout d'abord, l'orientation des recherches de l' Institut nous a engagé dans cette voie. Par ailleurs, quelques aspects de la dégradation enzymatique de l' AIA avaient été déjà partiellement étudiés par Mlle Lescure. Par similitude avec le problème du crown-gall, des déviations du métabolisme devaient résulter de l'acquisition de l'indépendance ; de plus l'utilisation et le stockage de l' AIA étaient complètement inconnus dans ce type de matériel.

Nous n'avons pas étudié si la culture indépendante possédait les propriétés d'un crown-gall ou d'une souche anergiée, par exemple production d'une tumeur lors du greffage sur une plante saine, qui auraient permis de préciser quelques notions, mais dont l'étude dépassait le cadre de notre travail, au même titre que l'aspect génétique, c'est-à-dire rechercher si l'indépendance résultait effectivement d'une mutation au sens strict. C'est pourquoi nous avons préféré utiliser le terme de variant phénotypique pour désigner la souche indépendante.

Néanmoins, au cours de ce travail, nous avons également employé le nom de mutant pour simplifier l'exposé ; il faut garder présent à l'esprit que cette dénomination est en fait un abus de langage.

Chapitre 2

MATERIEL

2.1. Historique.

Le matériel végétal utilisé pour ces travaux provient de la mise en culture sur milieu synthétique de tissu cambial d' Erable (Acer pseudoplatanus L.)

Cette souche, isolée par Northcote (1960) présente l'avantage de très bien s'adapter à la culture en milieu liquide, du fait de la très grande friabilité de ses cals, pour fournir des suspensions cellulaires contenant des agrégats de petite taille (1 - 15 cellules en moyenne) dont la prolifération est rapide.

Des lignées mutantes de cette souche originale dite souche "sauvage" ou souche "S" ont été obtenues par Lescure (1967) après traitement par un agent mutagène chimique : la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Parmi les mutants obtenus par cet auteur, nous nous sommes spécialement intéressés à l'un d'entre eux, appelé MB, qui présente la particularité de croître sans adjonction d'auxine dans le milieu de culture.

D'autres matériels sont connus pour leur indépendance vis-à-vis des auxines. Cependant, ceux-ci présentent le double désavantage de ne pas pouvoir être dissociés facilement en agrégats de petite taille pour la culture en milieu liquide et de croître à une vitesse relativement faible.

Les souches S et MB nous ont été fournies par le Dr Lescure (souche de Northcote). Les cals reçus de cet auteur ont été multipliés, puis adaptés à la culture en milieu liquide dans notre laboratoire.

2.2. Méthodes de culture.

2.2.1. Le milieu.

Deux milieux de culture ont été utilisés :

a) Milieu de Lamport modifié (Lescure 1969)

b) Milieu de Stuart et Street (1971) (voir tableau 1)

En effet, alors que la souche MB n'avait été maintenue que sur le milieu (a), la souche S avait été cultivée sur (a) et (b) parallèlement.

Il était plus judicieux de ne pas changer les conditions de culture tant qu'une quantité importante de cals n'était pas disponible. Ce n'est qu'après un nombre suffisant de repiquages que les souches ont montré une prolifération rapide, un aspect sain et l'absence de zones nécrosées.

Cependant, le milieu (a) apparait comme un milieu minimum. Il ne contient que de la thiamine et une auxine (si celle-ci est nécessaire) comme facteurs de croissance. Les autres vitamines et acides aminés contenus dans le milieu de Lamport non modifié (Lescure 1966) ayant été supprimés par Lescure. Il était en effet indispensable pour cet auteur qui recherchait des lignées mutantes différant de la souche sauvage par leurs exigences en facteurs de croissance, de déterminer quels acides aminés et quelles vitamines étaient indispensables au développement de la souche d' Acer.

Néanmoins, ce milieu ne permet pas un taux de croissance élevé et reproductible, particulièrement dans le cas de suspensions cellulaires diluées.

Tableau 1

Milieu de Stuart et Street (1971) pour les cultures d' Acer.

Macroéléments :	
KCl	750.0. mg/l
$NaNO_3$	600.0 mg/l
NaH_2PO_4 2 H_2O	150.0 mg/l
$CaCl_2$ 6 H_2O	111.7 mg/l
$MgSO_4$ 7 H_2O	250.0 mg/l
Microéléments :	
$ZnSO_4$ 7 H_2O	1.00 mg/l
H_3BO_3	1.00 mg/l
$MnSO_4$ 4 H_2O	0.10 mg/l
$CuSO_4$ 5 H_2O	0.03 mg/l
KI	0.01 mg/l
Fer :	
$FeCl_3$ 6 H_2O	1.00 mg/l
Substances organiques :	
Thiamine-HCl	1.00 mg/l
Ac. pantothénique	2.50 mg/l
Cystéine-HCl	10.00 mg/l
Choline-HCl	0.50 mg/l
Meso-inositol	100.00 mg/l
Urée	200.00 mg/l
6-furfuryl-aminopurine	0.25 mg/l
2,4-D	1.00 mg/l
Saccharose	20'000.00 mg/l
Bacto-Agar (Difco)	7'500.00 mg/l

pH ajusté à 5,2 par NaOH 0.1 N.

Nous avons par conséquent préféré cultiver les souches sur le milieu (b), plus riche, puisque seule l'exigence en facteur auxinique était étudiée.

Les souches S et MB qui n'avaient pas été cultivées sur ce milieu jusqu'alors ont pu être adaptées sans difficultés.

2.2.2. Cultures en milieu gélosé.

Le milieu (b) décrit sous 2.2.1. est préparé de la manière suivante :

- des prises de solutions stocks sont diluées dans un volume d'eau bidistillée égal au 2/3 du volume final désiré. On dissout encore dans cette solution la cystéine et la saccharose, puis le pH est ajusté à 5,2 par du NaOH 0.1 N. Cette solution est maintenue à température ambiante.

  De l'agar en poudre (0.75 g/100 ml de Bacto Agar Difco) est solubilisé à chaud dans 1/3 du volume final requis d'eau bidistillée et versé très rapidement dans la solution précédente, en agitant constamment.

  S'il s'agit d'un milieu destiné à la culture de la souche S, on ajoute encore 1 mg/l de 2,4-D.

  Le milieu tiède (env. 55°C) est immédiatement versé dans un entonnoir à séparation gradué et réparti dans les tubes de culture à raison de 30 ml par tube.

  Les milieux sont stérilisés par autoclavage de 25 minutes à 121°C, puis refroidis à 40°C dans une enceinte stérile.

  On rajoute encore à chaque tube 1,5 ml d'urée stérilisée par filtration (ampoule d'urée 40 o/o diluée 100 x par de l'eau stérile) à l'aide d'une seringue à répétition.

Les milieux sont conservés dans une enceinte stérile jusqu'au moment du repiquage.

Les cals sont transférés sur du milieu neuf toutes les 5 semaines au moins. La taille des explantats correspond à un cube de 0,5 cm. de côté environ.

Les cultures sont placées dans une chambre thermostatée à 27 $\pm$ 1 °C comportant une photopériode de 12 heures.

2.2.3. Cultures en milieu liquide.

Le milieu est préparé de la même manière que sous 2.2.2. en omettant l' agar, et réparti dans des bouteilles cylindriques de 1 litre, à raison de 100 ml par bouteille. Les bouteilles sont fermées par un bouchon de gaze bourré de coton non hydrophile et recouvert de papier alu.

Le matériel est autoclavé 25 min. à 121°C, puis refroidi à température ambiante dans une enceinte stérile. 4 ml d'urée 40 % stérilisée par filtration (ampoule scellée) sont dilués dans 80 ml d'eau stérile. On injecte 1 ml de cette solution par bouteille à l'aide d'une seringue à répétition.

Pour obtenir une suspension cellulaire, 1 à 2 cals de 30 jours sont placés dans 100 ml de milieu liquide et laissés 7 jours sur un agitateur orbital (vitesse de rotation : 120 rpm). Le cal, très friable, se dissocie après ce délai en petits agrégats.

La culture est alors filtrée sur un tamis en nylon de 300 μ de vide de maille pour éliminer les trop gros agrégats et ensemencée dans du milieu neuf à raison d'environ 500'000 cellules / ml (Lescure 1970a, Street 1973a).

Après l'ensemencement, le bouchon de coton est remplacé par un capuchon en acier inoxydable stérilisé.

Les bouteilles sont alors placées en position horizontale sur des rouleaux de Teflon tournant à une vitesse de 120 rpm. Dans ces conditions, il se forme sur les parois de la bouteille un film liquide qui assure une très bonne oxygénation du milieu, alors que les cellules sont agitées modérément (il a en effet été constaté qu'une forte agitation ralentit la prolifération des cellules).

Les suspensions sont repiquées tous les quinze jours, alors qu'elles se trouvent en phase stationnaire (voir 2.5.). Lors des premiers repiquages, les cultures sont filtrées sur des tamis en nylon de 100 μ de vide de maille. Au bout de quelques repiquages, ceci n'est plus nécessaire, pour autant que les cellules soient toujours repiquées en phase stationnaire.

La densité cellulaire à l'ensemencement n'est pas indifférente. Si la culture est trop diluée, aucune prolifération n'est observée, tandis que si la densité est trop élevée, le milieu s'épuise très rapidement et la culture dépérit (voir 2.2.5.)

Nous avons toujours effectué nos repiquages avec une densité à l'ensemencement égale ou supérieure à 300'000 cellules/ml.

De cette manière, on obtient généralement 3×10^6 cellules par ml après 15 jours de culture.

2.2.4. Etalement sur plaques de gélose (plating)

Au cours de la culture en milieu liquide, les cellules subissent des modifications de leur phénotype. Ceci se traduit notamment par une hétérogénéité cellulaire : plusieurs populations apparaissent dans la culture après un grand nombre de repiquages. L'aspect général de la culture varie, la vitesse de croissance ralentit, la production de tannins augmente.

Il est alors souhaitable de pouvoir réisoler une population cellulaire homogène, c'est-à-dire obtenir une lignée qui présente les caractères morphologiques et physiologiques de la souche initiale et qui servira à l'initiation d'une nouvelle culture.

Différentes techniques d'obtention de clones à partir d'une seule cellule ont été décrites, notamment celles utilisant une culture nourrice (cal)(Muir et al.1954) ou un étalement sur un milieu conditionné solide (Bergmann 1960). C'est cette dernière méthode qui a été utilisée au cours de ce travail en raison de sa grande simplicité, de son aspect quantitatif et de ses très bons résultats.

Description de la méthode.

Pour obtenir la croissance d'une culture très diluée, le milieu décrit au paragraphe 2.2.3. n'est pas suffisamment riche, la faible densité cellulaire requise ne permettant pas une production suffisante de facteurs de conditionnement (voir 2.5.) Dans le cas du plating, il est nécessaire d'étaler une culture comportant au maximum 5'000 cellules/ml de manière à obtenir des colonies bien séparées les une des autres.

Le milieu utilisé pour la culture des suspensions a donc été modifié de la manière suivante (Stuart et Street 1971) :

Milieu conditionné synthétique pour l'étalement des cultures diluées.

Macroéléments	:	inchangés
Microéléments	:	inchangés
Fer (selon Murashige et Skoog 1962)	:	5 ml/l d'une solution de Na_2EDTA (7.45 g/l) et de $FeSO_4$ 7 H_2O (5.57 g/l)
Vitamines	:	inchangées
Phytohormones	:	2,4-D 2 mg/l 6-furfuryl-aminopurine 0,5 mg/l Gibberelline A_3 0,25 mg/l
Acides aminés	:	ac. L-aspartique : 0.1 mg/l L-thréonine : 0.2 mg/l L-sérine : 0.3 mg/l ac. L-glutamique : 0.7 mg/l L-glycine : 0.2 mg/l L-alanine : 0.4 mg/l ac. α-amino-butyrique : 0.1 mg/l ac. γ-amino-butyrique : 0.7 mg/l L-valine : 0.1 mg/l L-isoleucine : 0.1 mg/l L-leucine : 0.1 mg/l L-tyrosine : 0.2 mg/l L-ornithine : 0.2 mg/l L-lysine : 0.1 mg/l L-histidine : 0.1 mg/l
Saccharose	:	20 g/l
Bacto-Agar (Difco)	:	6 g/l
pH	:	6.2 à 6.4

La culture à étaler est tout d'abord filtrée sur un tamis nylon de 100 μ de vide de maille, pour enlever les agrégats de grande et moyenne dimension, puis le nombre de cellules est déterminé dans cette suspension filtrée (voir 2.6.)

Cette culture est alors diluée par du milieu conditionné de façon à avoir 50 ml d'une suspension contenant de 5 à 10'000 cellules /ml.

50 ml de milieu conditionné contenant 1.2 g de Bacto-Agar sont autoclavés, puis maintenus à 40°C dans un bain-marie. Très rapidement, l'agar est versé dans la suspension cellulaire, mélangé, et les 100 ml obtenus sont répartis dans des boîtes de Pétri stériles avec une seringue à répétition, à raison de 10 ml par boîte.

Les boîtes de Pétri sont scellées par du Parafilm pour éviter le dessèchement et déposées dans un incubateur à 21°C durant trois semaines à l'obscurité, puis en salle de culture lumineuse (27°C , photopériode de 12 heures) durant 1 à 2 semaines. Les colonies formées sont sélectionnées, puis ensemencées dans des tubes à culture contenant le milieu standard.

2.3. Traitement mutagène et sélection des mutants.

Ce paragraphe est consacré aux méthodes de mutagenèse et de sélection pratiquées par Lescure (1970a) sur des suspensions cellulaires d'Acer.

Nous nous bornerons ici à résumer les difficultés rencontrées par cet auteur et à exposer la méthode de mutagenèse utilisée pour obtenir des mutants prototrophes à l'auxine.

Nous ne discuterons pas des aspects génétiques du problème qui n'ont pas place dans le contexte de notre travail.

a) Choix de l'agent mutagène.

L'utilisation de radiations ionisantes telles que les rayons ultra-violets, les rayons X ou les rayons gamma n'a pas donné de résultats satisfaisants. En effet, la dose à fournir est très forte (200'000 rads), ce qui provoque des perturbations des structures chromosomiques. La méthode par irradiation a donc été abandonnée au profit de techniques utilisant des mutagènes chimiques.

Deux agents d'alkylation ont été essayés : la N-méthyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine et le méthyle sulfonate d'éthyle. Seule la nitrosoguanidine a donné des résultats positifs. De plus, l'utilisation de cet agent provoque une dissociation des agrégats dans la suspension et libère de nombreuses cellules isolées, ce qui facilite la sélection ultérieure des mutants.

b) Sélection des mutants.

Une des principales difficultés rencontrées par Lescure a été la sélection des cellules mutées après traitement à la nitrosoguanidine.

En effet, les méthodes de sélection utilisées en bactériologie ne sont pas applicables aux cellules végétales ; ces dernières étant incapables de former des colonies à partir d'une seule cellule, sauf dans certaines conditions bien déterminées (voir 2.2.4.)

La méthode de sélection d'un mutant prototrophe à l'auxine consisterait à placer la suspension ayant subi le traitement mutagène sur un milieu gélosé dépourvu d'auxine. Les seules cellules capables de former des colonies seraient celles qui sont indépendantes de l'auxine.

Malheureusement, la formation d'un clone à partir d'une cellule végétale n'est possible que si la densité cellulaire à l'étalement est suffisamment élevée. Ceci n'est pas réalisable car le nombre de cellules / ml capables de se développer sur un milieu sélectif est extrêmement faible et la densité minimale n'est jamais atteinte.

Il était donc nécessaire d'enrichir la suspensions en cellules mutées avant de procéder à l'étalement, ce qui revient à pratiquer une sélection en milieu liquide.

c) Technique de mutagenèse et d'isolement de clones mutants insensibles à l'auxine.

La méthode pratiquée par Lescure se résume comme suit : 400 µg / ml de nitrosoguanidine sont ajoutés à une suspension cellulaire lavée contenant environ 50 % de cellules. La suspension est laissée 5 minutes sans agitation. Dans ces conditions, la "survie" des cellules est de l'ordre de 10 %.

Après filtration et lavage, les cellules sont remises en culture dans du milieu neuf durant 8 jours, puis passées dans un milieu sélectif (ne contenant pas d'auxine). Après environ 6 semaines de culture, de petits agrégats se développent. Lorsqu'ils sont suffisamment grands pour avoir une croissance autonome, ils sont repiqués sur un milieu gélosé dépourvu d'auxine.

2.4. Quelques caractéristiques des mutants.

A part leur indépendance vis-à-vis des auxines, les mutants obtenus par Lescure (1970a) présentent des différences phénotypiques avec la souche sauvage.

Il faut noter cependant que ces différences peuvent être dues au moins pour une part, à l'absence de 2,4-D dans le milieu de culture des mutants.

Le hyaloplasme des cellules mutantes est plus dense et contient plus de ribosomes que celui des cellules sauvages (Lescure 1970a).

Les cals mutants MB sont beaucoup moins friables que les cals S et, de ce fait, se dissocient moins facilement en milieu liquide. Cependant, la synthèse des parois cellulaires dépend des auxines (Roland et Pilet 1974). Néanmoins, ces données ne permettent pas à elles seules d'expliquer la plus grande friabilité des cals S.

D'autre part, les cals mutants présentent une coloration verte très nette, alors que la souche sauvage est de teinte jaunâtre. Cette coloration pourrait être due à l'absence de 2,4-D dans le milieu de culture de la souche MB (Sunderland 1966).

Durant les cinq ans pendant lesquels ces souches ont été entretenues, une culture S présentant une coloration verte n'est jamais apparue. Sa pigmentation permet donc de reconnaître aisément la souche MB et également d'apprécier son état physiologique. En effet, les cultures MB très faiblement colorées n'ont jamais donné des subcultures viables.

2.5. Croissance d'une suspension cellulaire.

La croissance d'une suspension cellulaire au cours du temps peut être mesurée selon différents critères. L'allure des courbes obtenues est évidemment directement liée au critère choisi.

Les critères les plus couramment utilisés sont : le nombre de cellules, le poids frais (PF), le poids sec (PS), l'index mitotique et la mesure de l'incorporation du $^{35}S^{*}$ dans les protéines.

Comme chacun de ces critères ne rend compte que d'un seul aspect de la croissance, le fait qu'il ne varie plus au cours du temps n'indique pas nécessairement que la croissance est stoppée. Par exemple, au début de la culture, le nombre de cellules n'augmente pas encore, mais le $^{35}S^{*}$ est déjà incorporé, témoignant d'une synthèse de protéines ; le taux en acides nucléiques augmente également.

Le critère de base qui sera utilisé tout au long de ce travail est le nombre de cellules par ml de culture. En fonction de ce critère, la courbe de croissance idéale d'une suspension cellulaire d' Acer est la suivante (Zrÿd et Pilet 1973) :

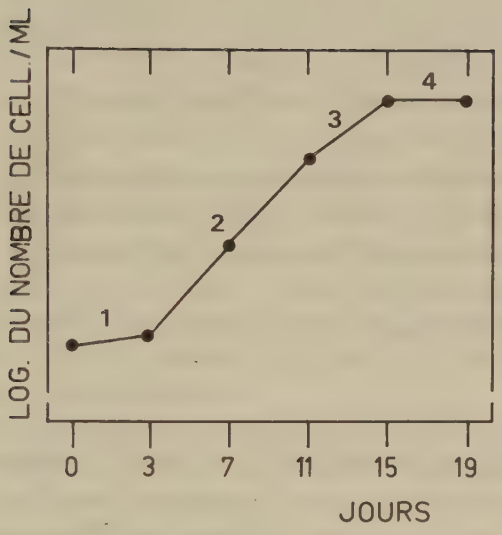


Figure 1 : courbe de croissance d'une culture cellulaire d' Acer (d'après Zrÿd et Pilet 1973).

1 = phase de latence

2 = phase exponentielle + phase linéaire

3 = phase de décélération

4 = phase stationnaire

La durée du cycle entier ainsi que celle de chaque phase dépend de plusieurs facteurs : la densité cellulaire à l'ensemencement principalement, le degré d'agrégation et la vitesse de croissance.

La durée de la phase de latence est inversement proportionnelle à la densité cellulaire initiale. Cette latence peut se prolonger indéfiniment (= croissance zéro) si le nombre de cellules par ml au départ est inférieur à un seuil. Ce seuil est défini par la composition du milieu. Plus le volume de l'inoculum est faible, plus le milieu doit être riche, de manière à compenser l'absence de facteurs de conditionnement émis par les cellules. Pour le milieu de Stuart et Street, ce seuil est de 9 - 15'000 cell/ml (Stuart et Street 1969), lorsque le transfert a lieu en plase stationnaire.

Dans les conditions de culture utilisées pour ce travail, la période de latence va du transfert au 3ème jour, la phase exponentielle et la phase linéaire du 3ème au 11ème jour, la phase de décélération du 11ème au 14ème jour environ, ensuite les cellules entrent en phase stationnaire au début de laquelle elles sont transférées. La densité cellulaire à l'ensemencement est de 250 - 300'000 cell/ml.

L'aspect microscopique des cellules varie considérablement au cours des différentes phases de croissance comme l'ont montré Henshaw et al. (1966)

Au moment du transfert en phase stationnaire, les cellules sont du type filamenteux et contiennent une grande vacuole. Leur cytoplasme est réparti en travées autour de celle-ci. La culture présente de nombreuses cellules isolées.

Au cours de la phase de latence, on assiste à une augmentation du contenu cytoplasmique, les cellules étant toujours très allongées.

Pendant les premières divisions, la taille moyenne des cellules diminue, et en phase linéaire, on n'observe plus que des massifs formés de cellules plus ou moins sphériques.

Dès que le rythme des divisions se ralentit, les cellules ont tendance à s'allonger de nouveau et à former des agrégats contenant peu de cellules. En phase stationnaire tardive, lorsque les mitoses ont complètement cessé, l'aspect des cellules est identique à celui observé au moment du transfert.

Ainsi qu'il a déjà été noté ci-dessus, le taux d'agrégation de la culture varie pour chaque phase, et ceci en raison inverse du nombre de mitoses observé.

Durant la phase de latence qui suit le transfert, un grand nombre de cellules isolées est observable. En phase linéaire, lorsque les cellules sont en division active, on ne rencontre que des massifs cellulaires contenant plus de 30 cellules, le nombre de cellules isolées étant alors extrêmement faible. Au niveau des agrégats, l'index mitotique est plus élevé que dans les cellules isolées (Henshaw et al. 1966). Puis, dès que le nombre de mitoses diminue, les agrégats contiennent de moins en moins de cellules, et des éléments isolés réapparaissent. Tout-à-fait en fin de culture, à partir du 20ème jour, on ne rencontre que très peu d'agrégats et uniquement des cellules isolées et des massifs de 3 - 10 cellules (Street 1973b).

Ce taux d'agrégation ne dépend pas uniquement de l'activité mitotique, mais est également influencé par la composition du milieu en phytohormones, la fréquence des transferts et l'agitation de la culture.

Il semble que les concentrations en auxine et en cytokinines peuvent modifier le taux d'agrégation de la culture. Ainsi, Simpkins et al. (1970) ont montré qu'une augmentation de la teneur en cytokinines du milieu de 50 fois permet une culture à court terme, en l'absence d'auxine ; mais les cellules s'agrègent de façon anormale et la culture brunit. D'autre part, avec une concentration standard en kinétine (2,5 mg/l) l'exigence en 2.4-D est absolue. L' AIA dans ces conditions ne permet aucune croissance.

L'acide α-naphtyl-acétique (NAA) peut remplacer le 2.4-D si la concentration en kinétine est quadruplée ; mais la croissance est très faible et les cellules s'agrègent complètement.

Des transferts fréquents, par exemple tous les 5 - 7 jours, pratiqués dans le but de maintenir les cellules en phase de division active peuvent conduire à une forte agrégation de la culture, puisque c'est justement à ce stade que le nombre de cellules par massif est le plus grand. Il convient donc de bien choisir la durée de la culture, de manière à avoir une suspension la plus dissociée possible (repiquage en phase stationnaire) avec en même temps une latence courte (repiquage en phase linéaire).

Enfin, nous avons constaté au cours de ce travail, que le type d'agitation utilisé pour cultiver les suspensions intervenait notamment au niveau de la dissociation des cellules. L'agitation orbitale horizontale "dissocie" plus la culture que la rotation horizontale des bouteilles.

2.6. Contrôles de la culture en suspension.

Au cours de la culture, différents paramètres sont à contrôler, afin d'assurer une bonne reproductibilité des phases de croissance chez les subcultures et d'éliminer toute culture présentant une infection discrète, quelquefois totalement inapparente.

a) Examen microscopique.

L'observation au microscope à contraste de phase d'une goutte de suspension a été pratiquée très régulièrement.

Un certain nombre de paramètres peuvent être retenus, à notre avis, pour apprécier la qualité de la suspension : une trop forte agrégation, l'absence de cyclose dans plusieurs cellules, une tendance à la plasmolyse trahissant une culture en mauvaises conditions physiologiques.

Il est très fréquent que la culture présente une contamination latente n'empêchant pas la croissance des cellules et qui, de ce fait, passe inaperçue. Dans ce cas, seul l'examen microscopique permet d'éliminer une telle culture afin de ne pas propager l'infection au cours des repiquages successifs.

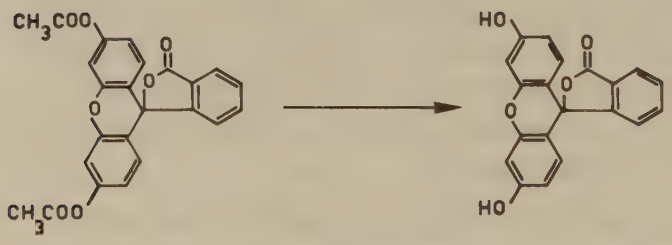
b) Tests de viabilité.

A intervalles réguliers, particulièrement lors de l'établissement d'une nouvelle suspension à partir d'un cal, le % de cellules vivantes a été déterminé.

La méthode testant l'hydrolyse enzymatique du diacétate de fluorescéine (Widholm 1972) a été le plus couramment employée, à cause de sa grande sensibilité et de la netteté de ses résultats.

Elle est basée sur l'activité d'enzymes hydrolasiques au niveau cellulaire :

le diacétate de fluoréscéine pénètre dans les cellules et n'est pas fluorescent en lumière ultraviolette. En première approximation, on peut considérer que si la cellule étudiée est vivante et possède des hydrolases actives, de la fluorescéine sera libérée par scission de la liaison ester entre la fluorescéine et le résidu acétyl, et une fluorescence verte caractéristique apparaîtra en UV.



Fluorescéine diacétate — Fluorescéine

Au moment du test, on prépare une solution aqueuse de diacétate de fluorescéine à 0.1 mg/ml à partir d'une solution stock acétonique à 5 mg/ml conservée à - 18° C. Cette solution aqueuse ne se conserve que quelques heures. On mélange directement sur la lame de microscope, une goutte de suspension cellulaire et une goutte de réactif. On laisse agir 2 à 5 min., puis on compte au microscope, pour le même champ :

(1) sous éclairage UV (lampe à vapeur de mercure) le nombre de cellules présentant une fluorescence verte et (2), en lumière visible, le nombre de cellules total.

Dans une culture en bonnes conditions, on trouve environ 80 - 90 % de cellules fluorescentes.

Une autre méthode de détection des cellules vivantes fait appel à la coloration par le Trypan Blue (Phillips 1973). Cette technique est basée sur la capacité des cellules vivantes de ne pas être perméables au colorant. Les cellules mortes, au contraire, laissent entrer le Trypan Blue grâce à une modification de la perméabilité du plasmalemme. Ainsi, seules les cellules mortes seront colorées.

Le test se fait également directement sur la lame de microscope, en mélangeant une goutte de suspension cellulaire à deux gouttes de Trypan Blue à 0.01 %. La coloration est immédiate.

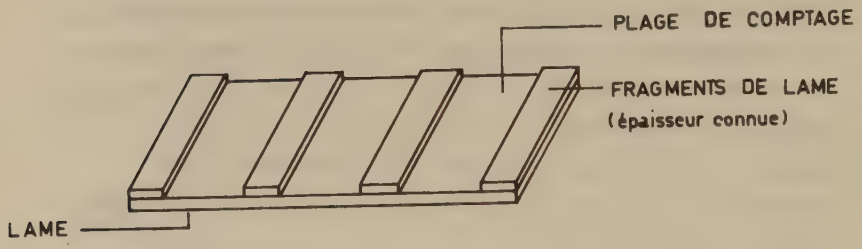
c) Comptage de cellules.

La méthode utilisée est inspirée de celle de Henshaw . et al. (1966).

A 2 ml de suspension cellulaire, on ajoute 10 ml d'acide chromique (CrO_3) à 10 % dans un tube comportant un bouchon à vis étanche.

Après digestion de 30 min. à 60°C, les cellules sont agitées très fortement sur un shaker "Microïd" (Baird and Taitlock Ltd) durant 5 min., à la vitesse maximum. On obtient par cette technique des cellules isolées sans avoir cependant de lyse importante.

Cette suspension est alors ajustée à un volume déterminé (100 - 500 ml selon la densité cellulaire), puis déposée sur une lame de comptage construite selon le schéma :



et recouverte d'une lamelle. Après 5 min. de sédimentation, la préparation est observée au microscope à un grossissement de 100 X. Si le nombre de cellules par champ microscopique est trop élevé, il faut diluer la suspension de manière à avoir de 10 - 20 cellules par champ.

On compte 10 champs pris au hasard sur chaque plage.

Si n est le nombre de cellules dans les 30 champs comptés, c, la surface du champ en mm^2 et e l'épaisseur de la couche liquide en mm, le nombre de cellules par ml de culture sera donné par la formule suivante :

$$\frac{1000\ n}{30\ c\ e} \times \text{dilution}$$

Chapitre 3

TECHNIQUES

3.1. Activité auxines-oxydasique.

3.1.1. Avant-propos.

Le phénomène d'indépendance vis-à-vis des auxines pourrait être expliqué en termes de catabolisme (voir 4.2.1.1.) Nous avons donc entrepris de comparer et d'étudier le catabolisme auxinique des deux souches d' Acer, normale et mutante. Deux techniques d'approche s'offraient alors ; nous avons convenu de les appeler :

1) étude "in vitro", c'est-à-dire mesure de l'activité auxines-oxydasique d'un broyat de tissus, purifié ou non.

2) étude "in vivo", c'est-à-dire évaluation de l'intensité de dégradation de l' AIA par des suspensions cellulaires intactes des deux souches.

Ces deux aspects ont été abordés chacun par une méthode spécifique et ont donné des résultats concordants.

3.1.2. Activité auxines-oxydasique "in vitro".

3.1.2.1. Principe.

A partir d'une suspension cellulaire filtrée et lavée, ou de cals, un extrait brut est réalisé par broyage dans un tampon,

suivi d'une centrifugation. Le surnageant est alors soit analysé directement, soit purifié par filtration sur gel de Sephadex.

Dans les deux cas, l'extrait est mis en présence d' AIA durant un temps donné. A la fin de cette période d'incubation, l' AIA restant est dosé. L'activité auxines-oxydasique est exprimée en pourcent d' AIA dégradé par unité de temps.

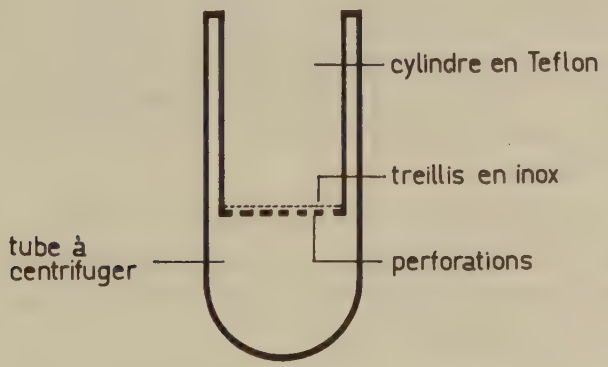
Des essais préliminaires ont démontré qu'un extrait brut de cellules ou de tissus de cal d' Acer ne possède pas d'activité auxines-oxydasique, quelles que soient les conditions de l'extraction et du dosage. Nous avons donc conclu à la présence d'inhibiteurs endogènes tels que les polyphénols qui abondent dans tout matériel végétal et qui seraient libérés lors de l'extraction (Loomis et Bataille 1966) :

Par conséquent, nous avons cherché à éliminer ces inhibiteurs par la méthode de tamisage moléculaire sur gel de Sephadex.

3.1.2.2. Préparation de l' extrait.

L'extraction est réalisée dans du tampon TRIS-EDTA pH 8.1, 1 M. On sait en effet qu'un pH élevé donne un meilleur rendement de l'extraction des auxines-oxydases (Pilet et al. 1966) La force ionique élevée de ce tampon permet de tenir compte de la teneur en eau élevée des cellules d' Acer (environ 90 %). Lorsque du matériel lyophilisé est extrait, ce tampon est dilué 5 fois. Il contient en outre deux agents anti-oxydants : disulfite de Na ($Na_2S_2O_5$) (Anderson 1968), 24 g/l et 2-mercapto-éthanol (C_2H_6OS), 4 ml/l. De plus, 100 g/l de saccharose sont ajoutés pour augmenter la densité de l'extrait, et permettre son dépôt sur la colonne de Sephadex. Ces trois composés sont ajoutés extemporanément au tampon.

Des cals (30 jours) ou une suspension cellulaire (15 jours) filtrée et lavée, sont pesés puis broyés en présence de 1 ml de tampon pour 5 g de tissus dans un homogénisateur de verre (Potter) durant 3 minutes, au bain de glace. Ce premier broyat est alors transvasé quantitativement dans un homogénisateur à billes de verre (Zillig et Hölzel 1958) en rinçant avec le tampon d'extraction dilué 5 x. On ajoute 1/2 volume cellulaire de billes de verre de ϕ 0,35 mm et 1/2 volume cellulaire de billes de 0,50 mm. L'appareil est enclenché à la vitesse maximale durant 3 minutes, en maintenant l'extrait à une température de + 1 ^{0}C par circulation d'eau glacée. Le temps de broyage nécessaire pour faire éclater toutes les cellules varie considérablement suivant le matériel. Nous avons déterminé cette durée en faisant une cinétique de la libération de protéines solubles dans le tampon. A partir de 2 à 3 minutes, la teneur en protéines demeurait stable. Après ce deuxième broyage, les billes de verre sont éliminées par essorage dans des tubes à centriguer modifiés spécialement selon le schéma ci-dessous (Determann 1969a) :



Par centrifugation de ces tubes (1000x g, 5 min.), on récolte l'extrait dont le volume est mesuré.

On rajoute alors à cet extrait 50 mmoles/ml de $CaCl_2$ pour précipiter les composés pectiques qui gênent la chromatographie sur Sephadex, puis on centrifuge 30 minutes à 40'000x g , température de 4°C.

Il est alors nécessaire de réduire le volume du surnageant de manière à pouvoir déposer sur la colonne de gel 5 à 10 ml au maximum. A cet effet, pour 10 ml de surnageant, on rajoute 3 g. de Sephadex G 25 coarse sec (indice de gonflement 2,5 ml d'eau par g. de gel sec) et on place le tout au frigo durant 15 minutes (Determann 1969b). Cette opération n'a pas d'effet sur la teneur en protéines de l'extrait à laquelle on se réfère pour exprimer l'activité enzymatique, puisque la limite d'exclusion de ce type de gel est inférieure au poids moléculaire des auxines-oxydases.

L'extrait est ensuite récupéré par essorage de 10 minutes à 1000x g dans les mêmes tubes que précédemment.

3.1.2.3. Purification de l'extrait par filtration sur gel.

Le principe de la chromatographie sur gel étant très connu (Determann 1969c), nous nous bornerons ici à en résumer le principe et à exposer l'application de cette technique à nos propres essais.

Le Sephadex se présente sous forme de billes de dextrane polymérisé, formant un réseau de chaînes polysaccharidiques de porosité constante. Ce polymère est très hydrophile et peut absorber une forte proportion d'eau.

Une fois gonflé, le Sephadex possède une porosité fixe déterminée. Selon leur poids moléculaire et leur structure tertiaire, les substances mises en présence du gel pourront soit y pénétrer, soit en être exclues. Les protéines dont le poids moléculaire est en-dessous de la limite d'exclusion du gel seront donc retardées dans leur migration par rapport aux molécules exclues qui circulent dans la phase dispersante, entre les billes de Sephadex.

Il est alors possible, sur une colonne dans laquelle on fait circuler la phase dispersante, de séparer les protéines selon leur taille.

Pour purifier les auxines-oxydases de l' Acer, nous avons utilisé du Sephadex de deux porosités différentes :

1) G 25 Superfine (domaine de fractionnement : 1000 - 5000 dalton)

2) G 100 Superfine (domaine de fractionnement : 4000 - 150'000 dalton)

(Pilet et Lavanchy 1969, Cronenberg et al. 1986)

Un système comportant deux colonnes couplées a été mis au point (voir fig. 2). Il était en effet très avantageux de pouvoir effectuer une première purification grossière sur G 25, de manière à éliminer les inhibiteurs de faible poids moléculaire, suivie d'une purification plus poussée sur G 100.

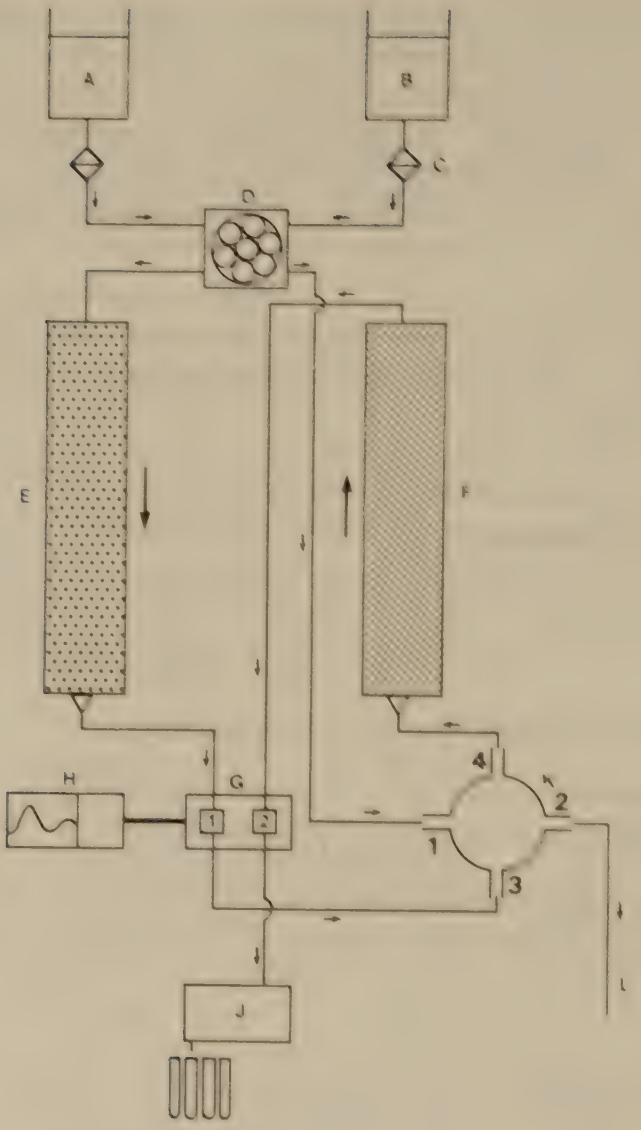

A
B
C
D
E
F
G
H
J
K
L
1
2
3
4

Figure 2 : Schéma du montage pour la filtration sur gel.

A et B : réservoirs de tampon stérile
C : filtres Millipore 0.40 µ
D : pompe péristaltique
E : colonne de Sephadex G 25
F : colonne de Sephadex G 100
G : photomètre UV (254 nm) avec deux cuves à flux continu (1 et 2)
H : enregistreur de densité optique
J : collecteur de fractions
K : vanne à quatre voies
L : vidange

Dimensions des colonnes : ϕ : 2,5 cm
longueur : 30 cm.

Les colonnes et le collecteur sont maintenus à une température de + 4°C.

Le couplage de deux colonnes permet d'éviter de redéposer l'extrait après son premier passage sur G 25. La durée de la purification est ainsi considérablement réduite et la manipulation de l'extrait ramenée au minimum.

L'élution est réalisée par du tampon borax-phosphate pH 8,2 , 5 mM. (Pilet et al. 1967). Elle a lieu en deux temps :

1er temps : valve en position 1-2, 3-4. L'échantillon est déposé au sommet de la colonne de G 25. La cuve 1 est placée dans le faisceau UV. La vitesse d'élution est réglée à 24 ml/h, le volume des fractions à 2,2 ml.
On laisse éluer jusqu'à l'apparition d'un premier pic qui contient toutes les protéines.

2ème temps : dès que la totalité du premier pic a été éluée de la colonne de G 25 et se trouve à la base de la colonne de G 100, on commute la valve en position 1-4, 3-2. De cette manière, la colonne de G 25 est découplée de la G 100. Les composés de faible poids moléculaire restés dans la G 25 sont élués par le tampon du réservoir A. Le réservoir B permet alors l'élution de la colonne de G 100 seule.
La cuve 2 est placée dans le faisceau UV , et on laisse l'élution s'achever complètement.

Toute la séparation a lieu à une température inférieure à + 4°C.

3.1.2.4. Dosage de l'activité auxines-oxydasique.

Les fractions récoltées sont maintenues au frigo durant une nuit, puis l'activité auxines-oxydasique est mesurée pour chacune d'entre elles.

a) par dosage de l' AIA dégradé.

L'incubation est faite dans des erlenmeyers à large col qui assurent une oxygénation correcte du milieu réactionnel. Le milieu d'incubation contient :

0.5 ml de $MnCl_2$ 10^{-3} M

1.0 ml de 2,4-dichlorophénol 10^{-3} M ou d'acide p-coumarique 10^{-4} M.

5.5 ml de tampon phosphate 1/15 M, pH 6.1

1.0 ml de la fraction à analyser.

Au temps zéro, ce mélange est mis en présence d' AIA (2 ml AIA 10^{-3} M).

On détermine la quantité d' AIA dans le mélange au temps zéro et après une heure d'incubation à 25° C par la réaction de Salkowski (Pilet 1957).

A cet effet, 1 ml du mélange réactionnel est ajouté à 4 ml de réactif de Salkowski (Pilet et Chollet 1970). Après 1 heure de coloration à 21° C, l'indice colorimétrique (IC) est mesuré à l'aide d'un colorimètre Klett-Summerson muni d'un filtre 540 nm.

L'activité auxines-oxydasique est exprimée en % d' AIA dégradé par heure selon la formule :

$$\frac{IC_o - IC_t}{IC_o} \times 100$$

Toutes ces opérations sont effectuées en lumière verte d'intensité réduite.

b) par spectrophotométrie des produits de dégradation de l' AIA.

Il nous a paru intéressant d'étudier la cinétique de dégradation de l' AIA par un extrait purifié, en présence de différentes concentrations en substrat et en cofacteurs. La méthode décrite ci-dessus ne se prête pas aisément à une analyse en continu.

L'oxydation de l' AIA par voie enzymatique produit des composés terminaux comportant un groupement oxindole (Hinmann et Lang 1965, Tuli et Moyed 1967) qui absorbent aux environs de 250 nm. Il parait donc possible d'utiliser cette propriété pour étudier l'activité auxines-oxydasique, en analysant le spectre d'absorption UV d'un mélange réactionnel contenant un extrait d'auxines-oxydases (Ray 1956).

Nous avons tout d'abord vérifié que cette méthode était applicable à notre matériel, puis nous avons déterminé avec précision la longueur d'onde à laquelle l'absorption de ces composés est maximale.

Les fractions actives obtenues après passage sur les colonnes de Sephadex ont été réunies, constituant ainsi un extrait purifié. Le volume considérable de cet extrait a été réduit par ultrafiltration sur une membrane Diaflo UM 20 E. Cette membrane est imperméable aux protéines de poids moléculaire supérieur à 10-15'000. Le volume final a été ajusté à 4 ml.

Le milieu d'incubation (3 ml) contient : $3{,}5 \times 10^{-4}$ M AIA, 10^{-4} M $MnCl_2$, 5×10^{-5} M 2,4-dichlorophénol, 0,25 M NaCl, dans du tampon phosphate pH 6,1.

Après injection de 200 μl d'extrait concentré, un spectre différentiel d'absorption en UV est tracé toutes les 5 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur Shimadzu. (voir fig. 3)

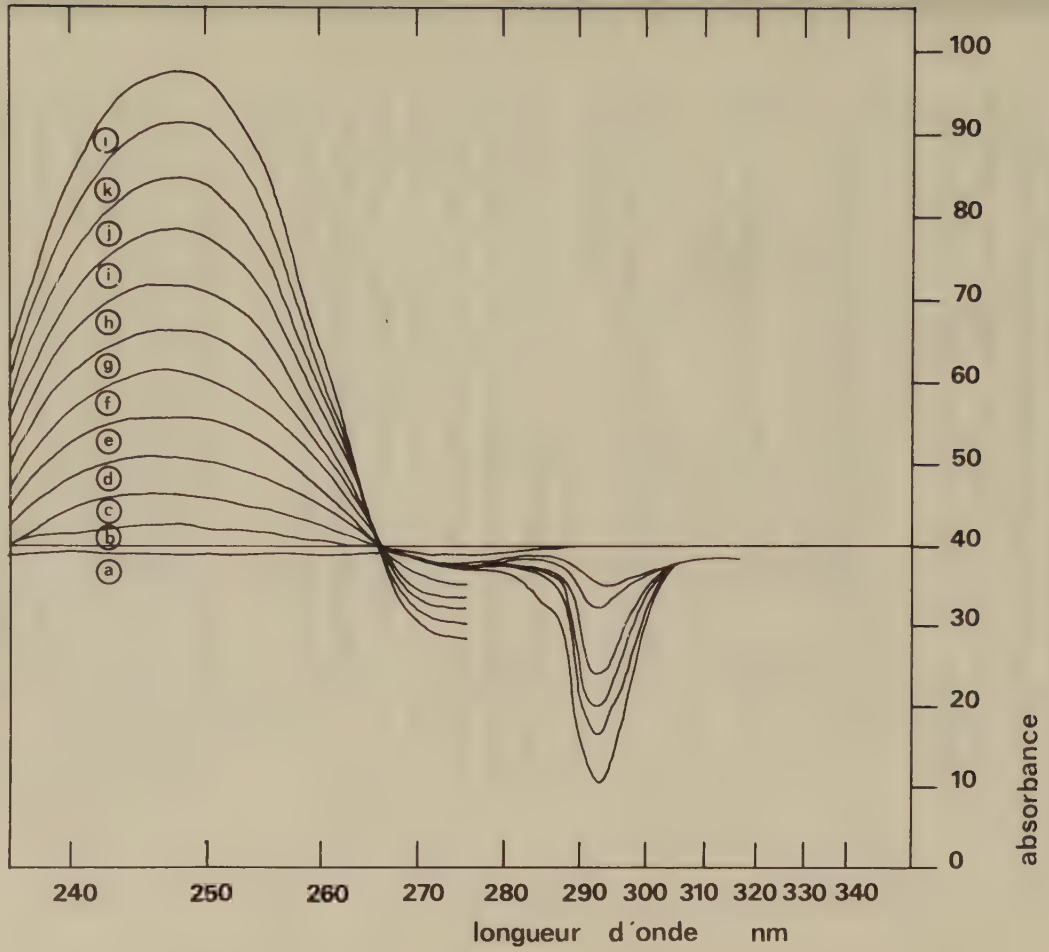

l
k
j
i
h
g
f
e
d
c
b
a
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
absorbance
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
longueur d´onde nm

Figure 3 : Spectres différentiels des produits de dégradation de l' AIA en fonction du temps d'incubation avec un extrait auxines-oxydasique purifié.

(a) : ligne de base au début de l'incubation
(b) : spectre après 5 min. d'incubation
(c) : après 10 min.
(d) : après 15 min.
(e) : après 20 min.
(f) : après 25 min.
(h) : après 30 min.
(i) : après 35 min.
(j) : après 40 min.
(k) : après 45 min.
(l) : après 50 min.

Extrait réalisé à partir de 5 g. de tissus d' Acer, souche MB, non lyophilisés.

Un pic d'absorption à 248 nm a pu être observé. D'autre part, l'amplitude de ce pic augmente au cours du temps alors que le pic correspondant à l' AIA diminue, prouvant ainsi qu'il s'agit bien de produits de dégradation de l' AIA. La longueur d'onde de 248 nm correspond à celle décrite pour les oxindoles par Hinmann et Lang (1965).

De plus, un point isobestique a pu être observé à 264 nm. Lescure (1970a) a obtenu des résultats identiques.

Cette technique d'analyse semble donc pouvoir être utilisée sur notre matériel.

Détermination des concentrations optimales en substrat et en cofacteurs.

Bien que plusieurs auteurs (Fox et Purves 1968, Gaspar et Dinant 1967, Lescure 1970b) aient utilisé le 2,4-dichlorophénol comme cofacteur des auxines-oxydases, nous avons préféré employer l'acide p-coumarique (Zrÿd 1967, Pilet et Lavanchy 1969, Pilet et Sevhonkian 1969), qui est un effecteur naturel présent dans la cellule végétale , alors que le dichlorophénol est un facteur artificiel (Zenk et Müller 1963, Tomaszewski 1964).

3 ml de milieu d'incubation contenant des concentrations variables en AIA , ac. p-coumarique et $MnCl_2$ sont déposés dans une cuvette en quartz de trajet optique 1 cm. Le pH est maintenu à 6,1 par du tampon phosphate (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) 1/15 M et la force ionique favorisant la formation du méthylène-oxindole est ajustée par 0.25 M NaCl (Hinmann et Lang 1965).

Au temps zéro, on injecte 200 µl d'extrait concentré et on suit l'augmentation de la densité optique (DO) à 248 nm au cours du temps à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss PM Q II.

3.1.3. Activité auxines-oxydasique "in vivo"

3.1.3.1. Principe.

Le dosage est basé sur la décarboxylation de l' AIA par une suspension cellulaire. Si le groupement -carboxyl de l' AIA est rendu radioactif par du ^{14}C, il est alors facile de récolter le CO_2^* libéré dans un piège à KOH et d'en mesurer la radioactivité.

Cette étape de décarboxylation semble constituer un phénomène général accompagnant la dégradation de l' AIA. Le problème des voies de dégradation de l' AIA étant loin d'être résolu actuellement, nous ne pouvons affirmer avec précision dans quelle étape cette décarboxylation se situe, ni à quels composés elle aboutit. Cependant, parmi les nombreux schémas existants (Pilet et Gaspar 1968), nous exposerons brièvement ici quelques uns de ceux qui justifient notre dosage, en rappelant encore une fois que s'ils rendent compte des phénomènes observés par les auteurs sur un matériel particulier, ils ne constituent qu'une hypothèse pour l' Acer.

Précisons encore que ces chaînes réactionnelles ont été étudiées pour la plupart sur des extraits enzymatiques et non sur des systèmes cellulaires.

Waygood, Oaks et Maclachlan (1955) étudient un extrait enzymatique de feuilles de Blé qui provoque une décarboxylation de l' AIA. Ils constatent que la peroxydase du Raifort possède les mêmes propriétés.

Ils proposent alors le schéma suivant (Waygood et Maclachlan 1956, Maclachlan et Waygood 1956) :

$$Mn^{2+} \xrightarrow[ROH]{\text{peroxydase}} Mn^{3+}$$

$$Mn^{3+} + S\text{-}COOH \longrightarrow Mn^{2+} + H^{+} + S\text{-}COO^{\bullet}$$

$$S\text{-}COO^{\bullet} \longrightarrow S^{\bullet} + CO_2$$

$$S^{\bullet} + O_2 \longrightarrow SO_2^{\bullet}$$

$$SO_2^{\bullet} + ROH \xrightarrow{\text{peroxydase}} SO_2H + RO^{\bullet}$$

(d'après Pilet et Gaspar 1968)

On voit qu'ici, la décarboxylation constitue une des premières étapes de la chaîne réactionnelle et donne naissance à un radical libre d' AIA.

Pilet (1962) a montré, à l'aide d' AIA marqué en position 1 ou 2 par du ^{14}C, que de la β -indolyl-aldéhyde se forme très rapidement (10 % de la radioactivité totale en 30 minutes). Ce passage a lieu en fait en 3 étapes : oxydation, déshydrogénation et décarboxylation, et ne fait intervenir que des modifications de la chaîne latérale de l' AIA, le cycle restant intact.

Si l'on envisage une ouverture du cycle indolique, on retrouve néanmoins une décarboxylation (Galston 1956, Pilet 1962). Dans ce schéma, le cycle est d'abord ouvert par une oxydation suivie d'une décarboxylation, formant ainsi de l' o-formamido-acetophénone. Une décarboxylation de la chaîne latérale cette fois donne naissance à l' o-amino-acetophénone. Dans ce cas, la décarboxylation n'apparaît plus comme une étape primaire.

La décarboxylation peut donc être considérée comme une étape nécessaire, quelle que soit la chaîne réactionnelle proposée.

3.1.3.2. Incubation.

Les cellules sont prélevées stérilement d'une suspension cellulaire âgée de 12 jours et lavées 3 x par du milieu de culture frais (pH 5,2) dans des tubes à centrifuger gradués. Au dernier rinçage, le volume cellulaire sédimenté (PCV) est ajusté à 20 % du volume total (environ 2×10^6 cellules / ml).

On introduit 2 ml de cette suspension dans une fiole de Warburg stérile contenant :

a) un carré (1,5 cm) de papier Whattman saturé par 0,1 ml de KOH 40 % dans la cupule centrale.

b) 0,1 μCi d' AIA-1-^{14}C dilué par de l'AIA froid dans 0,5 ml (concentration finale $2,5 \times 10^{-5}$ M, activité spécifique finale 1,60 μCi/μmole, Radiochemical Centre, Amersham GB) dans le bras latéral.

Les fioles sont ensuite équilibrées 30 minutes à 26°C, puis le contenu du bras latéral est mis en contact avec les cellules.

Après 60 minutes d'incubation, les papiers contenant le KOH sont retirés et mis à sécher 30 minutes sous une lampe infra-rouge.

Les cellules sont récupérées par filtration sur de la soie à bluter de 25 μ de vide de maille et rincées une fois par de l' AIA 10^{-3} M et deux fois par de l'eau bidistillée. Les cellules rincées sont alors très rapidement congelées dans de l'azote liquide.

3.1.3.3. Comptage du $^{14}CO_2$ libéré.

Une fois secs, les papiers Whattman contenant le $K_2{}^{14}CO_3$ sont introduits dans 10 ml de mélange scintillant toluène - Omnifluor contenant 25 % d' éthanol absolu.

Les fioles de comptage sont agitées, puis placées au frigo. La radioactivité est mesurée après 6 heures de diffusion des papiers par un compteur à scintillation Nuclear-Chicago Mark I, à 4° C. Chaque fiole est comptée au moins 10 minutes et le comptage est répété 3 fois.

Parallèlement, deux fioles témoins ne contenant que du scintillateur sont comptées pour la détermination du bruit de fond.

3.2. Analyse des composés indoliques formés.

3.2.1. Incubation.

Nous avons étudié successivement les produits de dégradation de l' AIA-1-^{14}C et de l' AIA-2-^{14}C dans les cellules et dans le milieu d'incubation.

a) Incubation avec AIA-1-^{14}C.

voir 3.1.3.2.

b) Incubation avec AIA-2-^{14}C.

Les cellules provenant d'une suspension cellulaire âgée de 8 jours sont prélevées et lavées comme sous 3.1.3.2. Dans ce cas, le volume sédimenté (PCV) n'est pas ajusté, mais le nombre de cellules est déterminé (Henshaw et al. 1966).

5 ml (10 ml) de la suspension lavée sont introduits dans un erlenmeyer 25 ml (50 ml) stérile et préincubés 30 minutes à 26° C sur un agitateur orbital.

Puis on injecte rapidement 0.2 μCi (0,4 μCi) d' AIA-2-^{14}C dans 0,5 ml (1 ml) d' AIA 10^{-4} M (concentration finale : $1,033 \times 10^{-5}$ M, activité spécifique finale : 3,87 μCi/μmole).

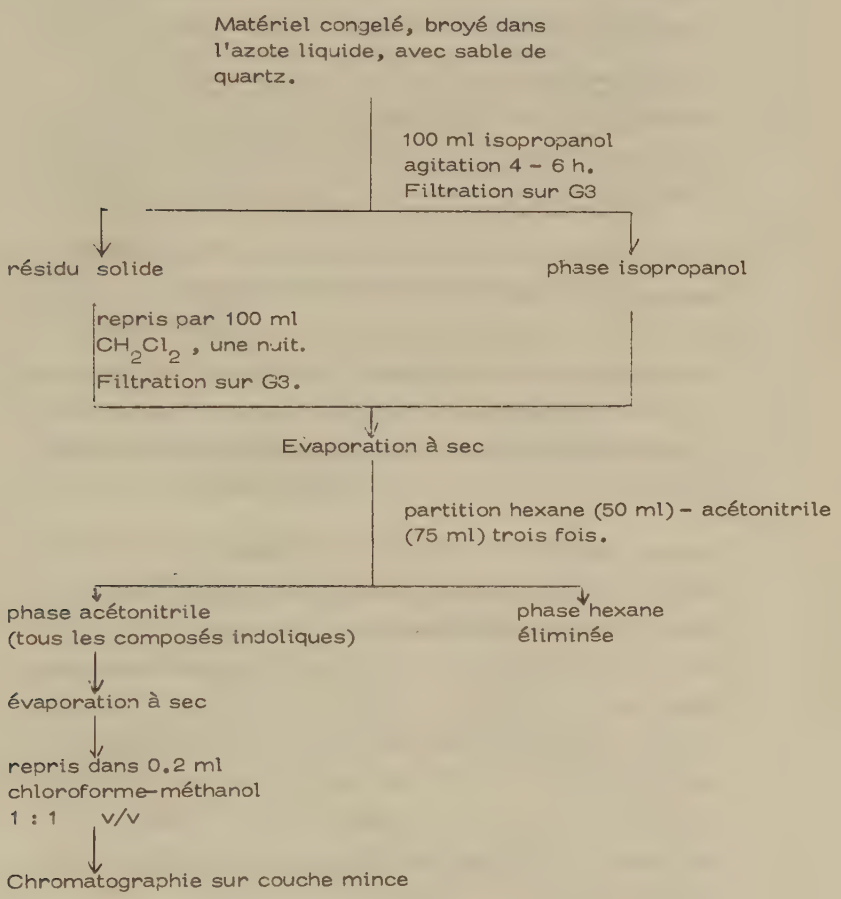
Après 2 heures d'incubation à 26° C, les cellules sont filtrées sur soie à bluter, rincées une fois par de l' AIA 10^{-3} M et deux fois par de l'eau bidistillée, puis congelées dans de l'azote liquide.

3.2.2. Extraction des composés indoliques.

a) dans les cellules.

Le schéma d'extraction proposé par Stowe et al. (1968) a été utilisé avec quelques modifications destinées à l'adapter à notre problème particulier. Le rendement de cette méthode peut aller jusqu'à 80 %, comme nous l'avons contrôlé en l'appliquant à de l' AIA pur dosé par la réaction de Salkowski (Pilet et Chollet 1970).

Tableau 2 : Schéma d'extraction des composés indoliques (d'après Stowe et al. 1968).



Les cellules congelées, après incubation avec de l' AIA-1- ou -2- ^{14}C, sont broyées au mortier dans de l'azote liquide, en présence de sable de quartz, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette poudre est alors transférée dans 100 ml d'isopropanol à - 80°C et agitée durant 6 heures.

La phase isopropanol est ensuite filtrée sur verre fritté (porosité G4) et évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif. Le résidu est réextrait une nuit dans 100 ml de dichlorométhane à - 80°C sous agitation constante.

Le dichlorométhane est alors filtré, combiné avec la phase isopropanol et évaporé à sec dans le même récipient (extrait I). On ajoute immédiatement à cet extrait I sec, 50 ml d'hexane et 75 ml d'acétonitrile et on le transfère dans une ampoule à décantation. Après agitation de 90 secondes, la phase acétonitrile inférieure est récupérée. L'hexane est encore lavé deux fois par 50 ml d'acétonitrile.

La phase acétonitrile totale est alors évaporée à sec au RotaVapor (température inférieure à +40°C) (Extrait II). L'extrait II est solubilisé par 5 fois 1 ml d'un mélange chloroforme - méthanol (1 : 1 vol/vol) et transféré dans de petits tubes comportant un bouchon en Teflon hermétique. L'extrait est évaporé à nouveau sous un courant d'azote, puis repris dans 0,2 ml de chloroforme-méthanol. Afin de dissoudre le précipité qui se forme fréquemment lors de l'évaporation sous azote, l'extrait est soumis aux ultra-sons dans un "ultrasonic cleaner" d' horloger.

Cet extrait contient tous les composés indoliques (acides, neutres et basiques) présents dans la cellule incubée.

b) dans le milieu d'incubation.

Le milieu récolté après filtration des cellules est traité selon Stowe et al. (1968)

1 g.de $NaHCO_3$ est dissout dans ce milieu dont le volume est ensuite ajusté à 50 ml. Dans une ampoule à décanter, on ajoute aux 50 ml de milieu, 50 ml de dichlorométhane. Après agitation de 90 sec., la phase CH_2Cl_2 contenant les composés acides et hydrosolubles est récoltée (extrait A). La phase bicarbonate (extrait B) contenant les composés neutres et basiques est lavée une fois par du dichlorométhane. Le CH_2Cl_2 est mélangé à l'extrait A qui est acidifié à pH 3 par de l' HCl.

Après une nouvelle partition par le dichlorométhane, on obtient une phase aqueuse (extrait A1) contenant les composés hydrosolubles et une phase organique (extrait A2) contenant les composés acides.

L'extrait B est alors séparé par 50 ml d' HCl 1 N.

On récupère à nouveau une phase aqueuse contenant les composés basiques et une phase organique contenant les composés neutres.

Toutes ces opérations se déroulent en lumière verte d'intensité très réduite.

3.2.3. Chromatographie sur couche mince.

a) dépôt des taches.

L'extrait de composés indoliques obtenu sous 3.2.2. partie a) est déposé sur une plaque de gel de silice de 250 μ d' épaisseur, à l'aide d'une pipette effilée

(Merck 20 x 20 cm precoated TLC silicagel plates, without fluorescent indicator), sous forme d'une bande de 2 cm. de longueur.

Sur la même plaque, des taches circulaires d' AIA et de différents standards (IAAm, IAAsp...) sont également déposées.

b) solvants.

Deux mélanges de solvants ont été principalement utilisés :

1) Acétate de méthyle - isopropanol - ammoniaque 25 % (45 : 35 : 20) abrégé AMIN (Collet et al. 1964)

2) Chloroforme - acétate d' éthyle - acide formique (50 : 40 : 10) abrégé CAEF (Zenk 1964).

D'autres mélanges ont été utilisés pour un problème particulier. Ils seront définis ultérieurement.

c) migration.

Après séchage, les plaques sont placées dans une cuve en verre Shandon contenant 200 ml de mélange de solvants. Afin d'assurer une bonne saturation de la plaque et de la cuve, du papier buvard est appliqué sur toutes les faces de la cuve. Celle-ci contient encore une plaque vierge imprégnée de solvants (plaque de saturation). La plaque comportant les extraits est introduite dans la cuve à quelques mm. de la plaque de saturation, les côtés supportant la silice se faisant face (Collet et al. 1964). De cette manière, la plaque de migration est très rapidement saturée par les vapeurs de solvants de la plaque de saturation et le solvant monte très régulièrement.

Lorsque la hauteur du solvant atteint 10 cm., la plaque est retirée et séchée à l'obscurité au foehn froid.

d) choix d'un révélateur.

Ce choix est conditionné par différents aspects pratiques.

Dans le cas d'une chromatographie préparative (voir 3.4.) destinée à purifier un des composés de l'extrait, on fait migrer sur la même plaque parallèlement à cet extrait, un certain nombre de standards, afin de déterminer le Rf de ou des substances que l'on désire isoler. Ces substances étant toutes incolores, il s'agit de révéler les standards, puis de gratter les zones correspondantes de l'extrait. Il est évident que la substance à analyser ne doit pas être altérée lors de la révélation des standards. Il faut donc protéger la partie de la chromatographie comportant l'extrait lors de l'aspersion du révélateur. Ceci est aisément réalisé par une plaque de verre. Mais la plupart des révélateurs des composés indoliques nécessitent un chauffage de 50 - 100°C pour réagir. A ces températures, les composés de l'extrait sont dégradés. Il s'agit donc de disposer dans ce cas d'un révélateur agissant à température ambiante. Le réactif de Salkowski ($FeCl_3$-H_2SO_4) remplit ces conditions. Sa composition, modifiée par Pilet 1957, est la suivante :

3 ml de $FeCl_3$ 6 H_2O 1,5 M
60 ml H_2SO_4 concentré (d = 1,84)
100 ml H_2O bidistillée.

On peut éventuellement rajouter à ce réactif 25 % d'acétate d'éthyle pour le rendre plus volatil.

Les colorations spécifiques apparaissent à température ambiante après 5 minutes. La couleur reste stable pendant environ 30 minutes, puis change légèrement sans jamais disparaître cependant.

Dans une chromatographie analytique (voir 3.3.4.), le problème ne se pose pas, puisqu'il suffit de récupérer la partie comportant l'extrait séparé avant la révélation. Dans ce cas, seuls les critères de spécificité et de sensibilité sont à considérer.

Pour ce type de problème, nous avons principalement utilisé deux autres révélateurs :

- réactif de Prochazka à la formaldéhyde + chauffage de 5 minutes à 110°C. Observation en lumière ultra-violette (Stahl 1969a).
- réactif d' Ehrlich à la 4-diméthyl-amino-cinnamaldéhyde + chauffage de 5 minutes à 70°C (Stahl 1969b).

3.2.4. Evaluation de la radioactivité sur le chromatogramme.

Dès que la plaque est sèche, la silice comportant l'extrait séparé est découpée en 20 bandes de 0,5 cm à l'aide d'une lame de rasoir. Chaque bande est détachée du support de verre en grattant légèrement avec la lame de rasoir, puis transférée quantitativement dans un flacon à scintillation contenant 10 ml de scintillateur (voir 3.1.3.3.) (Mann et Jaworski 1970). Le bruit de fond de chaque flacon a été déterminé au préalable.

Après agitation, les flacons sont comptés à + 4°C, 2 h., 12 h. et 22 h. après l'introduction de la silice. Il est connu que la radioactivité maximale est atteinte après 1 h. de diffusion dans le scintillateur, dans le cas de blocs d'agar radioactifs (Pilet et Pernet 1970).

Dans ces conditions, le rendement du compteur évalué par du toluène-^{14}C est de 85 %.

La radioactivité en coups par minute de chaque zone est représentée par la moyenne des 3 comptages dont on soustrait le bruit de fond. Elle est reportée sur un graphique comportant, en abscisse, les unités de Rf. On y reporte également les limites de Rf (inférieure et supérieure) des substances standards.

3.3. Localisation du complexe auxines-oxydasique.

3.3.1. Préparation de protoplastes d' Acer.

La technique est inspirée de celle de Rona et Grignon (1972). Les différentes étapes, adaptées à nos conditions, sont décrites ci-dessous :

(1) Plasmolyse.

Des cellules d' Acer âgées de 4 jours sont filtrées stérilement sur un tamis nylon de 25 µm de vide de maille et lavées par du milieu de culture fraîchement préparé. Elles sont ensuite remises en suspension à une densité cellulaire de 800'000 cellules par ml. dans 120 ml de milieu de culture habituel, auquel on ajoute 6 % de saccharose et 9 % de sorbitol ; le pH est ajusté à 5.5.- Les cellules sont incubées dans cette solution plasmolysante durant 2 h à 25° C, sous une agitation orbitale de 120 rpm.

(2) Digestion enzymatique.

On ajoute alors 24 ml du même milieu plasmolysant que sous (1), contenant :

1 g. de cellulase d' Aspergillus niger (Sigma)
1 g. de cellulase de Trichoderma viride (BDH)
1 g. de pectinase (Sigma)
100 mg. de Macerozyme R-10 (Sigma)
100 mg. de sulfate de dextrane.

L'incubation est de 18 h. environ, à 25° C.

(3) Purification.

La suspension est alors filtrée sur tamis nylon de 300 µm, puis 100 µm, en exprimant toute la phase liquide.

Celle-ci est alors filtrée sur 75 µm. Ce filtrat est centrifugé à 130 x g pendant 5 min., et le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu sous agitation modérée par 20 ml de milieu de culture 0.6 M en sorbitol. On dépose alors sous cette suspension 10 ml de saccharose 1 M, sans mélanger les phases, et on centrifuge à nouveau à 130 x g , 5 min.

Les protoplastes, situés à l'interface, sont récupérés à l'aide d'une pipette Pasteur.

3.3.2. Incubation.

Nous avons testé simultanément des cellules intactes, des cellules plasmolysées et des protoplastes.

Avant l'incubation, les cellules intactes sont lavées 3 fois par du milieu neuf et 10 ml de suspension sont déposés dans des erlenmeyers de 50 ml fermés hermétiquement par un bouchon supportant un morceau de papier Whattmann imbibé de 0.1 ml de KOH 40 %.

Les protoplastes et les cellules plasmolysées sont également lavées par du milieu neuf, 0.6 M en sorbitol, et 10 ml sont déposés dans des erlenmeyers identiques à ceux des cellules intactes.

Les erlenmeyers sont alors équilibrés 30 min à 27°C, sur un agitateur orbital.

Au début de l'incubation, 1 ml d' AIA-1-^{14}C est injecté à chaque erlen (concentration finale : 10^{-5} M ; radioactivité spécifique finale : 2 μCi / μmole).

Les cellules intactes et plasmolysées sont incubées durant 1 h., les protoplastes durant 2 h. Un témoin, constitué du milieu seul, sans cellules, est incubé parallèlement pour l'estimation de la décarboxylation spontanée de l' AIA *.

3.3.3. Comptage du CO_2 radioactif dégagé.

A la fin de l'incubation, les papiers Whattmann contenant du $K_2CO_3^*$ sont mis à sécher 1 h. sous une lampe infrarouge et introduits dans 10 ml de scintillateur. Après refroidissement à 4° C, les fioles sont comptées pendant 10 min. (cf 3.1.3.3.)

3.4. Chromatographie en phase gazeuse (GC) d'un extrait purifié de composés indoliques.

Après chromatographie sur couche mince (solvant : AMIN) d'un extrait (voir 3.2.2.) correspondant à 10 ml de suspension cellulaire, les zones de silice correspondant à l' AIA et à la β -indolyl-acétamide sont récupérées et extraites trois fois par du chloroforme.

Après évaporation à sec du chloroforme sous un flux d'azote, le résidu solide est dissout dans 50 µl de pyridine et 100 µl de BSTFA (N,O-bis-(triméthylsilyl-)-trifluoro-acetamide) contenant 1 % de triméthylchlorosilane comme catalyseur (Bandurski et Schulze 1974). Le mélange est laissé une nuit à + 4°C.

Des aliquotes (2-10 µl) de cette solution sont injectées dans la colonne de GC (GasChrom W acid washed DMCS 80 - 100 mesh contenant 3 % OV 17 comme phase liquide). La température initiale de la colonne est de 150°C, puis est élevée selon un gradient de 4°C par minute.

Le détecteur utilisé est du type à ionisation de flamme. Le chromatographe est un Varian Aerograph series 1400 équipé d'un enregistreur Varian Aerograph series 20. (McNair et Bonelli 1969).

Chapitre 4

RESULTATS

4.1. Inventaire des problèmes.

4.1.1. Teneur en AIA endogène.

Avant d'aborder une étude plus détaillée des métabolites de l' AIA, nous avons tenu à contrôler si l'acide β-indolyl-acétique existait réellement dans la cellule d' Acer et dans quelles proportions, de façon à pouvoir discuter des rapports existant entre l'activité auxines-oxydasique et le contenu endogène en AIA.

4.1.2. Activité auxines-oxydasique.

Nous étudierons tout d'abord, dans ce paragraphe, l'activité et les propriétés des auxines-oxydases présentes dans un extrait de cellules ou de cals d' Acer, étude que nous avons convenu d'appeler "activité in vitro". Puis, pour vérifier la réalité physiologique des résultats obtenus, nous analyserons l'activité des auxines-oxydases de la cellule intacte, étude que nous appelerons "activité in vivo".

Au cours de cette étude, nous serons conduits à examiner le devenir de l' AIA fourni à une suspension cellulaire et, par conséquent, à nous intéresser aux produits de dégradation

de l' AIA radioactif rencontrés dans le cytoplasme de la cellule d'une part, et dans le milieu d'incubation d'autre part.

4.1.3. Produits conjugés de l' AIA.

Une étude plus poussée des métabolites de l' AIA* rencontrés dans la cellule nous a conduits à admettre l'existence de produits de conjuguaison de l' AIA. Nous avons ainsi pu mettre en évidence deux types principaux de conjugués, l'acide β-indolyl-acétyl-aspartique et un β-indolyl-glucoside. Enfin, dans une dernière étape, nous avons tenté de déterminer quel était le sucre qui, en liaison ester avec l' AIA, formait le β-indolyl-glucoside.

4.1.4. Localisation du complexe auxines-oxydasique.

Certains des résultats précédents, notamment ceux concernant la localisation des produits de dégradation, nous ont amenés à formuler une hypothèse selon laquelle les auxines-oxydases ne seraient pas localisées dans le cytoplasme.

Pour confirmer (ou infirmer) cette hypothèse, nous avons étudié l'activité de décarboxylation de l' AIA* de protoplastes obtenus à partir de cellules d' Acer.

4.2. Teneur en AIA endogène.

4.2.1. Avant-propos.

a) signification biologique.

Avant d'aborder une étude détaillée du métabolisme de l' AIA dans les suspensions normales ou mutantes de cellules d' Acer, nous avons étudié le taux en AIA endogène de ces deux souches.

Si la quantité d' AIA libre, par conséquent disponible, différait d'une souche à l'autre, le phénomène d'indépendance à l'auxine de la souche MB devenait plus facile à comprendre et peut-être même à expliquer.

b) problèmes méthodologiques.

En 1934 déjà, Kögl et al. mettent en évidence dans l'urine un composé qu'ils nomment hétéroauxine, et qui est, en fait, de l'acide β-indolyl-acétique. Dès lors, de nombreuses méthodes d'extraction et de dosage de l' AIA à partir de matériel végétal ont été développées.

Le dosage est rendu extrêmement difficile par les faibles quantités d' AIA contenues dans les tissus (inférieures au nanogramme par gramme de poids frais.)

Les méthodes les plus couramment utilisées font appel à des tests biologiques sur des fragments d'organes, soit coléoptiles d' Avena (Sirois 1966) ou de Triticum (Pilet et Dubouchet 1962), soit de racines de Lens (Pilet 1963) ou d'autres espèces. A part ces tests d'allongement, des dosages mettant en jeu la courbure de coléoptiles d' Avena ont été décrites. Une étude comparative des différents tests effectués sur divers matériels végétaux a été réalisée par Pilet (1961).

Ces techniques, bien que très sensibles, permettent l'analyse d'"AIA-like substances" mais ne sont pas spécifiques d'un composé de nature chimique bien définie. D'autre part, la pureté d'une substance isolée par chromatographie sur papier ou sur couche mince n'étant pas très grande, on observe en fait la sommation des effets de différents composés sur l'allongement.

Une comparaison entre les résultats d'un test biologique (allongement du mésocotyle) et ceux de la chromatographie en phase gazeuse d'un même extrait auxinique a été faite récemment par Champault (1975). Un spot de chromatographie sur papier contient en fait plusieurs substances, dont certaines se comportent comme des inhibiteurs de l'allongement et, masquant ainsi l'effet de l' AIA, en empêchent le dosage quantitatif.

Il faudrait donc pouvoir disposer d'un extrait auxinique hautement purifié, ne contenant théoriquement que de l' AIA, ce qui semble difficile à obtenir.

Néanmoins, les dosages quantitatifs réalisés à partir de tests biologiques ont permis d'obtenir des indications intéressantes sur le contenu auxinique endogène de divers végétaux. Par exemple, Athanasiadès-Mercanton (1964) a réussi, grâce au test coléoptile de Blé (Pilet et Dubouchet 1962), à doser une teneur en AIA endogène de 50 µg par kg de poids frais de racines de Lentilles de 18 mm. Greenwood et al. (1973) ont estimé le contenu en auxine de différentes régions de la racine et de la coléoptile par le test d'allongement d' Avena. La stèle contiendrait environ 142 µg/kg, le cortex 1 µg/kg, la pointe de racine de 15 mm 63 µg/kg. Ces résultats ont été confirmés par la technique de GC-MS par Bridges et al. (1973) :

le contenu en AIA de la stèle serait, par cette technique, de 53 µg/kg et du cortex de 4.8 µg/kg.

Burnett et Audus (1964) relèvent que, bien que certains tests biologiques soient très sensibles (par exemple le test racine de Pois, dont la limite de détection est de 10^{-5} µg/kg), ils sont totalement non spécifiques. L'erreur sur l'estimation quantitative du contenu en AIA par ces techniques est au minimum de 30 - 40 %.

Une étude critique des techniques utilisées pour mettre en évidence une auxine physiologiquement active a été réalisée par Scott et Jacobs (1964).

Notons enfin qu'en 1955 déjà, Larsen doutait de la validité des tests biologiques pour le dosage quantitatif de l' AIA, à moins que ce composé soit présent sous une forme assez pure pour que d'autres substances pouvant interférer sur le test biologique soient absentes.

Comme nous désirions mettre en évidence de l'acide β-indolyl-acétique, ces méthodes ne pouvaient donc pas convenir.

De plus, de nombreux auteurs ont noté l'importance d'utiliser les mêmes organes de la même espèce pour l'extraction et le dosage des hormones de croissance (Lexander 1953, Pilet 1958, Jerchel et Müller 1951). Cette condition ne pouvait évidemment pas être remplie dans le cas des suspensions cellulaires d' Acer.

Nous avons alors décidé d'utiliser des méthodes physico-chimiques.

Des extraits de composés indoliques bruts, ou purifiés par chromatographie sur couche mince de silice, ont par conséquent été passés sur chromatographie en phase gazeuse.

Les essais effectués sur des extraits triméthyl-silylés, avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) n'ont pas permis de mettre en évidence l' AIA que nous recherchions.

Ce type de détecteur étant sensible à tous les types de composés, nous avons pensé que l' AIA dérivé pouvait être masqué par d'autres pics de plus grande amplitude, migrant à des temps de rétention identiques ou très voisins.

Afin d'obtenir une meilleure discrimination des composés, nous avons alors employé un détecteur à capture d'électrons (ECD). Ce type de détecteur n'est sensible qu'aux composés capables d'absorber des électrons, comme par exemple les dérivés halogénés.

Des extraits ont été réalisés à partir de 10 g de cellules par la méthode de Rivier et Pilet (1974). Ces extraits furent alors traités pour former un double dérivé.

Dans une première étape, on forme des liaisons méthyl-ester par réaction avec du diazométhane gazeux (Schlenk et Gellermann 1960, Stowe et Schilke 1963). La seconde étape consiste à fixer sur l'azote du noyau indolique un résidu heptafluorobutyryl, par réaction avec de l'heptafluorobutyryl-imidazole (Bertilson et al. 1972, Rivier et Pilet 1974). On obtient ainsi un dérivé halogéné volatil dans les conditions de chromatographie et détectable par l' ECD.

Des aliquotes d'extrait contenant comme standard interne du 5-méthyl-AIA ont été introduites dans le chromatographe en phase gazeuse.

Quel que soit le volume injecté, aucun pic significatif d' AIA n'a pu être décelé.

Nous pouvons donc conclure que la quantité d' AIA présente dans notre matériel est très nettement inférieure à la limite de détection de la GC. En effet, la quantité minimale détectable par GC-FID dans un liquide biologique se situe aux environs de 0.5 - 3 µg selon le rapport 1974 de la World Health Organization concernant les drogues.

Avec le détecteur à capture d'électrons, la limite de détection est abaissée jusqu'à 100 pg d' AIA-heptafluorobutyryl-méthylester (Powell 1972). Cependant, dans ces conditions limites, l' AIA est masqué par d'autres pics, rendant toute quantification impossible (Seeley et Powell 1974).

La méthode n'est donc pas suffisamment discriminatoire pour permettre de doser notre extrait partiellement purifié. Une purification plus poussée était réalisable, mais aurait entraîné des pertes trop importantes, compte tenu de la quantité de matériel de départ (10 g PF de cellules). Travaillant déjà dans des conditions limites, nous avons par conséquent renoncé à purifier plus complètement l'extrait.

Il fallait donc faire appel à une technique à la fois plus sensible et plus spécifique, capable de déceler des fractions de ng. Cette extrême sensibilité est atteinte par le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (GC-MS).

4.2.2. Méthode.

Bien que la spectrométrie de masse soit connue et utilisée depuis longtemps en chimie organique, son couplage à la chromatographie en phase gazeuse est beaucoup plus récent et date de 1964. Le problème de ce couplage était de rendre possible l'analyse directe en MS de l' effluent d'une colonne

de GC (Hammar et al. 1969).

Sans entrer dans les détails, nous résumerons brièvement le principe de cette technique qui n'est encore que rarement utilisée en biologie.

La fig. 4 montre schématiquement un spectromètre de masse. Les composés sortant de la colonne de GC sont ionisés à leur entrée dans le MS par un bombardement d'électrons. Les molécules sont ainsi fragmentées et ionisées. Le degré de fragmentation et d'ionisation dépend de l'énergie réglable du flux d'électrons, de la masse de la molécule et de la température.

Seules les molécules entières ayant perdu un électron et les fragments chargés positivement seront analysés et détectés. Ces ions sont alors accélérés par des plateaux chargés négativement et pénètrent dans le tube d'analyse recourbé. Au centre de ce tube, un champ magnétique variable dévie les ions selon le rapport de leur masse à leur charge (m/e). m/e peut être calculé par la formule :

$$m/e = \frac{R^2 H^2}{-2E}$$

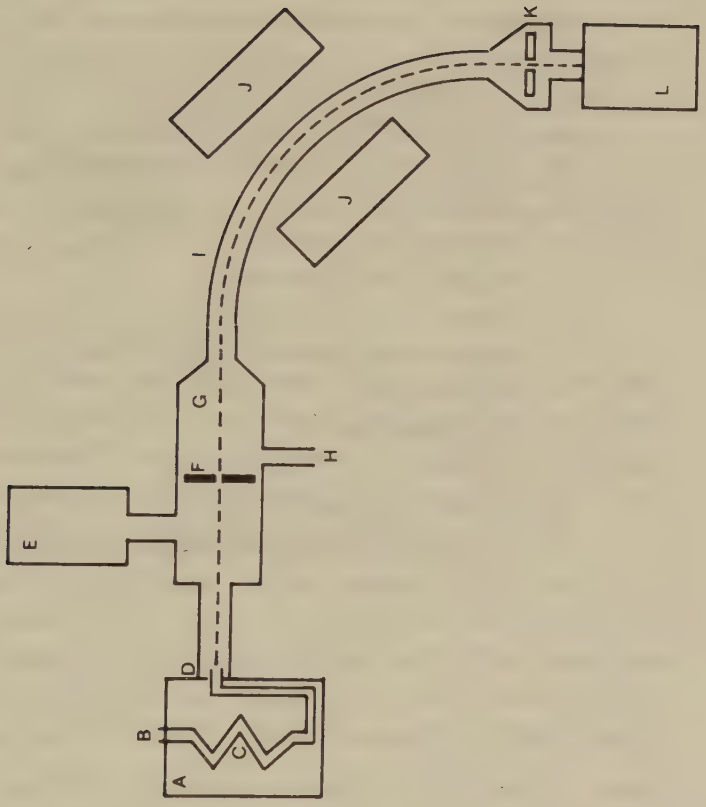

K
L
J
J
I
G
H
F
E
D
B
C
A

Figure 4 : Schéma du couplage entre chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.

Légende :

A. Contrôle et programmation de la température du chromatographe en phase gazeuse.
B. Septum d'injection dans la colonne de GC .
C. Colonne de GC .
D. Sortie de la colonne de GC .
E. Source d' ions (électrons) .
F. Fente de la source d'ions .
G. Plateaux d'accélération (potentiel négatif).
H. Pompe à vide .
I. Tube analyseur .
J. Aimant
K. Fente du collecteur.
L. Collecteur d' ions et amplification du signal.

Où m est la masse, H l'intensité du champ magnétique variable, E le voltage d'accélération et e le nombre d' électrons perdus (en général un).

Puis les ions passent à travers la fente d'un collecteur. Cette fente ne laisse donc passer qu'une partie des ions selon l'intensité du champ magnétique. Par une variation continue du champ, des ions de m/e croissant sont amenés en face de la fente et atteignent le système de détection (scanning). Toutes ces opérations se font extrêmement rapidement, environ 5 secondes selon le domaine de m/e exploré (Hammar et al., 1969).

Préparation de l' extrait.

Des cultures S et MB âgées de 7 et 15 jours sont lyophilisées après congélation dans l'azote liquide. Le matériel deshydraté est conservé dans des sachets en plastic soudés, à une température de - 20° C jusqu'au moment de l'emploi. Le transport du matériel a été fait dans des récipients isothermes.

Des prises de 200 mg (PS) sont extraites selon la technique de Rivier et Pilet (1974). Du 5-méthyl-AIA est ajouté au moment du broyage comme standard interne. Des dérivés heptafluorobutyryl-méthylester sont formés de manière à repérer les pics éventuels d' AIA sur GC avant d'engager ce pic dans le MS.

Un spectre de masse d'une molécule d' AIA-heptafluorobutyryl-méthylester a été proposé par Rivier et Pilet (1974). A part la molécule entière (m/e : 385), deux fragments principaux sont formés : l'un résultant de la scission du groupement acétate-méthylester (m/e 326), l'autre de la perte, en plus, de la fonction heptafluorobutyryl.

Les pics considérés pour l'analyse seront m/e 385 et m/e 326. Pour le standard interne, dont la fragmentation semble suivre le même schéma, l'analyse des mêmes fragments (m/e 399 et m/e 340) procure une référence précise.

4.2.3. Résultats.

Dans le tableau 3, nous avons représenté quelques valeurs obtenues lors de cette analyse. L'état des cellules lyophilisées est extrêmement important. En effet, si la dessiccation n'est pas complète, soit à cause d'une mauvaise lyophilisation, soit à la suite d'une réhydratation accidentelle lors de la conservation, aucune trace d' AIA ne peut être décelée.

Nous avions préparé des duplicatas de 7 et 15 jours pour les deux souches, mais à la suite du phénomène cité plus haut, une partie du matériel a dû être éliminée.

Ainsi, la comparaison entre des cellules de 7 et 15 jours est-elle moins rigoureuse, puisqu'il s'agit en fait de deux cultures différentes et non de cellules issues du même repiquage.

D'autre part, les quantités d' AIA étant extrêmement faibles et à la limite de détection de l'appareil, les erreurs absolues sont considérables et les différences ne sont pas significatives.

Cependant, nous pouvons quand même conclure à la présence indiscutable d' AIA dans les cellules d' Acer, à des taux très faibles correspondant à une molarité de 10^{-8} à 10^{-9}.

Tableau 3 : Teneur en AIA endogène des souches S et MB estimée par GC-MS .

âge	S	MB
	AIA en ng/200 mg PS	AIA en ng/200 mg PS
7 j.	3,798 $\pm$ 1,038 *	1,672 $\pm$ 1,787
15 j.	2,833 $\pm$ 1,714	2,679 $\pm$ 1,724 *

* : cellules issues d'un même repiquage.

4.2.4. Observations.

Malgré une technique d'analyse extrêmement précise, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence une différence significative dans la teneur endogène en acide β-indolyl-acétique des duplicatas de deux lots des souches S et MB.

Cependant, la présence d' AIA a pu être révélée, bien que la concentration endogène en cette hormone soit environ 175'000 fois plus faible que dans l' apex radiculaire de Zea Mays et 300 fois moindre que dans la zone de 1.0 - 4.0 mm subapicale du même matériel (Rivier et Pilet 1974).

Nous verrons plus loin l'importance de certains phénomènes de conjugaison de l' AIA à des sucres ou des acides aminés. Si l' AIA endogène est également soumis à ce processus, la technique d'analyse en GC-MS ne révèlera pas ce type de composés. En effet, la formation d'un dérivé méthyl-ester d' AIA est bloquée, le groupement carboxyl de l' AIA étant occupé par une liaison ester avec un sucre ou une liaison peptidique avec un acide aminé. Sans la liaison méthyl-ester, l' AIA-heptafluorobutyryl n'est pas volatil et ne peut donc pas être chromatographié en GC.

Il n'est donc pas exclu de prétendre que le taux très faible en AIA libre déterminé dans nos cultures puisse être causé par une très forte conjugaison de l' AIA endogène.

La concentration en AIA libre de 10^{-9} M est encore capable de provoquer des allongements lors d'un test biologique, et ceci jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^{-10} M, qui ne peuvent en aucun cas être dosées par une méthode physico-chimique telle que la GC, avec les restrictions concernant la validité et la spécificité des tests biologiques vues sous 4.2.1.

4.3. Activité auxines-oxydasique.

4.3.1. Activité AIA-ox "in vitro".

4.3.1.1. Avant-propos.

L'indépendance vis-à-vis des auxines acquise par la souche MB après traitement mutagène peut être produit par trois causes différentes (Lescure 1970b) :

a) biosynthèse des auxines accrue chez MB
b) dégradation des auxines plus faible chez MB
c) indépendance réelle, c'est-à-dire que l'auxine n'est plus nécessaire à la croissance de la souche MB.

Il a été démontré que la quantité d' AIA synthétisé à partir de tryptophane n'est pas significativement différente dans les deux souches, en première analyse (Lescure 1970c).

Nous avons donc entrepris l'étude du point b) concernant le catabolisme de l' AIA.

Quelques différences concernant surtout l'activité peroxydasique et les cinétiques d'oxydation de l' AIA par des extraits des deux souches ont été mises en évidence par Lescure (1970b). Cet auteur n'a pas noté de différences dans la répartition électrophorétique des isoperoxydases d'extraits bruts S et MB, mais, par contre, l'activité de certaines bandes différait sensiblement.

Les différences dans les cinétiques AIA-ox des deux souches ont amené Lescure à postuler une modification conformationnelle des enzymes.

Nous avons abordé le problème sous un angle différent, en nous attachant plus spécialement à d'éventuelles différences quantitatives dans les activités du complexe auxines-oxydasique pris

globalement, sans nous attacher spécialement aux peroxydases qui ne constituent qu'un élément du complexe enzymatique responsable de la dégradation de l' AIA.

Des essais préliminaires ont montré que des extraits bruts obtenus par simple homogénisation et centrifugation du matériel végétal (cals) ne présentaient pas d'activité AIA-ox, en ce sens que la teneur en composés se colorant en présence du réactif de Salkowski (Houff et al. 1954) ne variait pas au cours du temps.

Des modifications de la concentration en cofacteur phénolique (2,4-dichlorophénol) (Pilet 1957, Gaspar et Pilet 1964, Fox et Purves 1968) ou en $MnCl_2$ (Gaspar et Dinant 1967) n'ont eu aucun effet.

Ce fait a également été signalé par Lescure (1970c). Des extraits bruts obtenus à partir d'une poudre acétonique étaient totalement inactifs. Ce n'est qu'après passage de l'extrait sur Sephadex G 25 que cet auteur a pu mettre en évidence une activité AIA-ox.

Il est connu que, lors du broyage, différents inhibiteurs sont libérés (Loomis et Bataille 1966). Ces inhibiteurs sont généralement de nature phénolique. Pilet (1964) a démontré que l'acide chlorogénique (ou acide 3-caffeoylquinique) est un inhibiteur du système auxines-oxydasique. D'autres composés phénoliques de faible poids moléculaire sont également capables d'inhiber la dégradation enzymatique de l' AIA. Par exemple, le catéchol et un dérivé phénolique oxydé, l' hydroquinone (Pilet et Mato 1967). Ces substances provoquent des inhibitions pouvant aller jusqu'à 83 % , à la plus haute concentration testée (2×10^{-7} M).

Stonier et Yoneda (1967) ont pu mettre en évidence, dans la tige jeune de Pharbitis, deux inhibiteurs de la destruction de l' AIA. Ces composés sont de poids moléculaire élevé (1'500 - 5'000 pour l'un, 5'000 - 10'000 pour l'autre). Ils sont hydrosolubles et disparaissent de l'extrait en quelques heures, si celui-ci est conservé à température ambiante. Ces protecteurs semblent, d'après ces auteurs, pouvoir être assimilés aux complexes protéine-phénols découverts par Phipps (1965). L'élongation de la tige semble être placée sous le contrôle de ces complexes (Yoneda et Stonier 1967).

Enfin, signalons qu'une étude bibliographique approfondie des inhibiteurs phénoliques végétaux a été élaborée récemment (Schneider et Wightman 1974).

Nous avons donc conclu à la présence de tels inhibiteurs dans nos extraits bruts et nous avons, par conséquent, entrepris de les purifier.

4.3.1.2. Problèmes méthodologiques.

L'extrait a été purifié par tamisage moléculaire sur colonnes de Sephadex, dont le principe est énoncé sous 3.1.2.3.

Un des problèmes posés par ce type de chromatographie est la limitation du volume de l'extrait déposé sur la colonne. En effet, ce volume doit être faible (5 - 10 ml) de manière à ce que l'extrait forme au départ de la colonne une bande la plus mince possible. Ce n'est qu'à cette condition que l'on obtient une séparation satisfaisante. D'autre part, comme nous avons utilisé deux colonnes couplées l'une à l'autre, il ne fallait pas que la dilution de l'extrait due à son passage

sur la première colonne ne nuise à sa séparation sur la deuxième. Il fallait donc disposer d'un extrait très concentré.

Plusieurs méthodes existent pour concentrer un extrait, notamment l'évaporation sous vide, la dialyse contre du Ficoll, l'ultra-filtration et le dessalage par Sephadex.

Les deux premières n'ont pas donné de résultats satisfaisants, l'extrait perdant une grande partie de son activité au cours des opérations. Nous avons retenu les deux dernières techniques qui ont l'avantage de la rapidité et de la fiabilité (pas d'adsorption, activité intacte).

Le dessalage par du gel de Sephadex sec se fait très rapidement. Le gel à utiliser est choisi en fonction de la réduction de volume désirée et de la nature de l'extrait. On peut jouer sur la réticulation et le taux de gonflement du gel pour résoudre ces problèmes. Cependant, il est conseillé de ne pas utiliser des gels de type Superfine. En effet, le petit diamètre des billes de dextrane formant ce type de gel rend difficile la récupération de l'extrait.

A ce propos, nous avons pu constater que la séparation du sephadex gonflé et de l'extrait par centrifugation entraîne des pertes considérables. Nous avons pour cette raison pratiqué un essorage dans des tubes spéciaux (voir 3.1.2.3.). De cette façon, tout le liquide est récolté et la concentration est tout-à-fait quantitative.

Concentration de l'extrait purifié.

Les fractions actives récoltées après chromatographie sur Sephadex sont réunies pour constituer l'extrait purifié.

Le volume de cet extrait est considérable (env. 50 ml), donc son activité par unité de volume est très faible. Sa concentration

par la technique décrite ci-dessus nécessitant l'emploi d'une grande quantité de Sephadex, nous avons préféré l'ultra-filtration.

Une gamme étendue de membranes sélectives pour des protéines globulaires de poids moléculaires variés sont à disposition dans le commerce. En choisissant une membrane perméable à des substances de PM faible seulement (Diaflo UM 20E), il était donc possible de concentrer l'extrait en protéines enzymatiques, sans en modifier la teneur en sels. En opérant à une pression de 2.5 atm., une réduction de volume de 10 fois peut être effectuée en 45 minutes environ.

4.3.1.3. Résultats.

Les fig. 5 et 6 montrent des diagrammes d'élution d'extraits protéiniques provenant des souches S et MB, obtenus par enregistrement de la densité optique à 254 nm. Sur ces diagrammes, nous avons reporté parallèlement l'activité auxines-oxydasique exprimée en % d' AIA dégradé par heure par 1 ml de fraction et la teneur en protéines des fractions dosée par la réaction de Folin (Lowry et al. 1951).

L'examen des figures montre que le pic de DO 254 nm isolé sur Sephadex G 25 ne se décompose pas en plusieurs pics lors de son fractionnement ultérieur sur G 100. Ce fait démontre que les protéines formant ce pic sont de PM élevé et relativement homogène. D'autre part, le volume d'élution de ce pic est semblable pour les deux souches.

Le pic de protéines, révélé par la réaction de Folin, présente dans les deux cas un décalage de 2 fractions (Ve = 8.4 ml) avec celui de DO 254 nm.

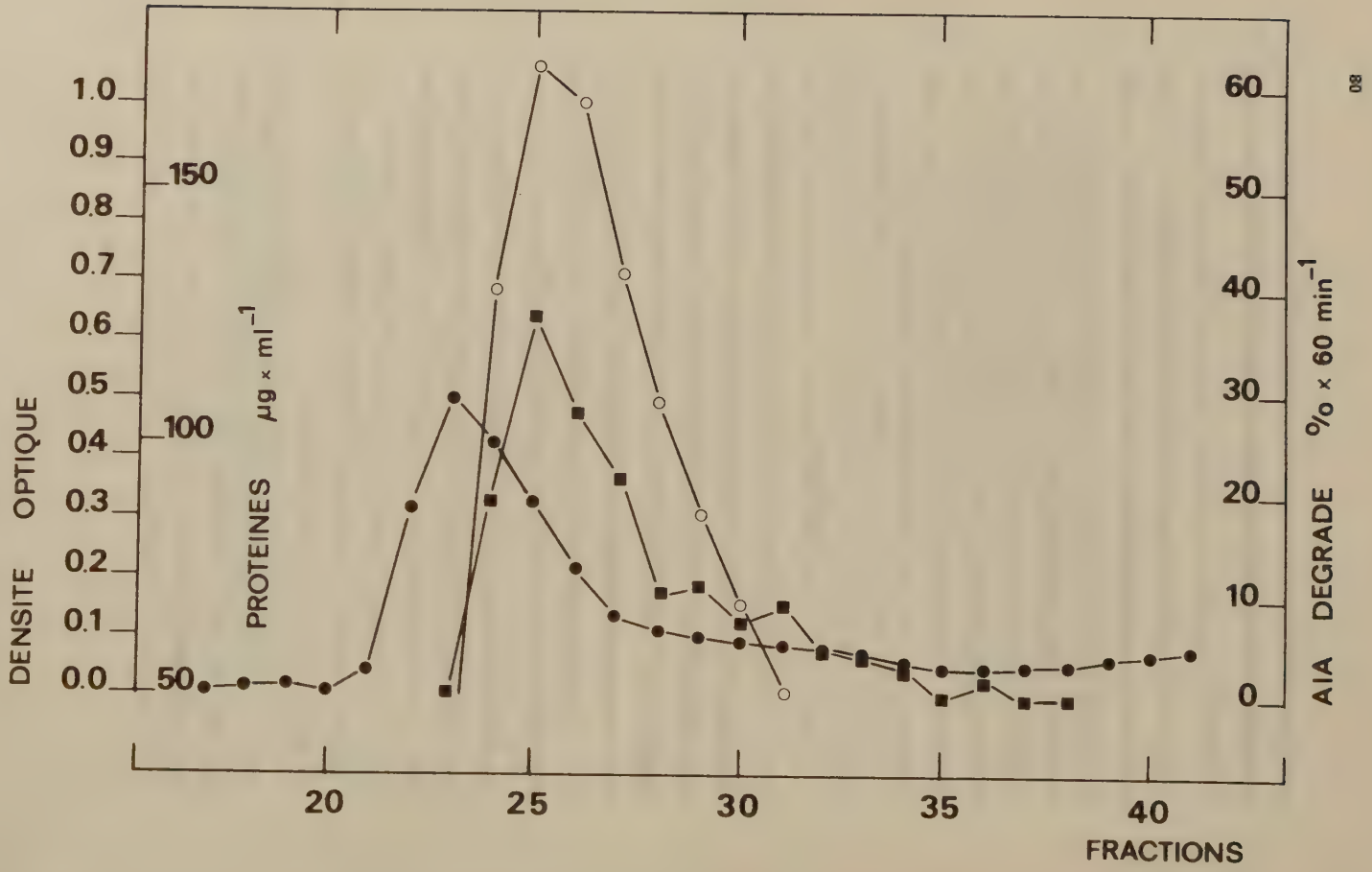

DENSITE OPTIQUE
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
PROTEINES µg × ml⁻¹
150
100
50
AIA DEGRADE %o × 60 min⁻¹
60
50
40
30
20
10
0
20
25
30
35
40
FRACTIONS

Figure 5 : Diagramme d'élution sur Sephadex G 100 des auxines-oxydase et des protéines d'un extrait de 500 mg (PS) de cals S lyophilisés.

L'extrait a été purifié au préalable sur Sephadex G 25

—●— : DO à 254 nm

—○— : concentration en protéines en µg / ml

—■— : activité AIA-oxydasique en % d' AIA dégradé par heure.

Débit d' élution : 24 ml / h.

Volume des fractions : 4.2 ml

Température : 4° C $\pm$ 0.5

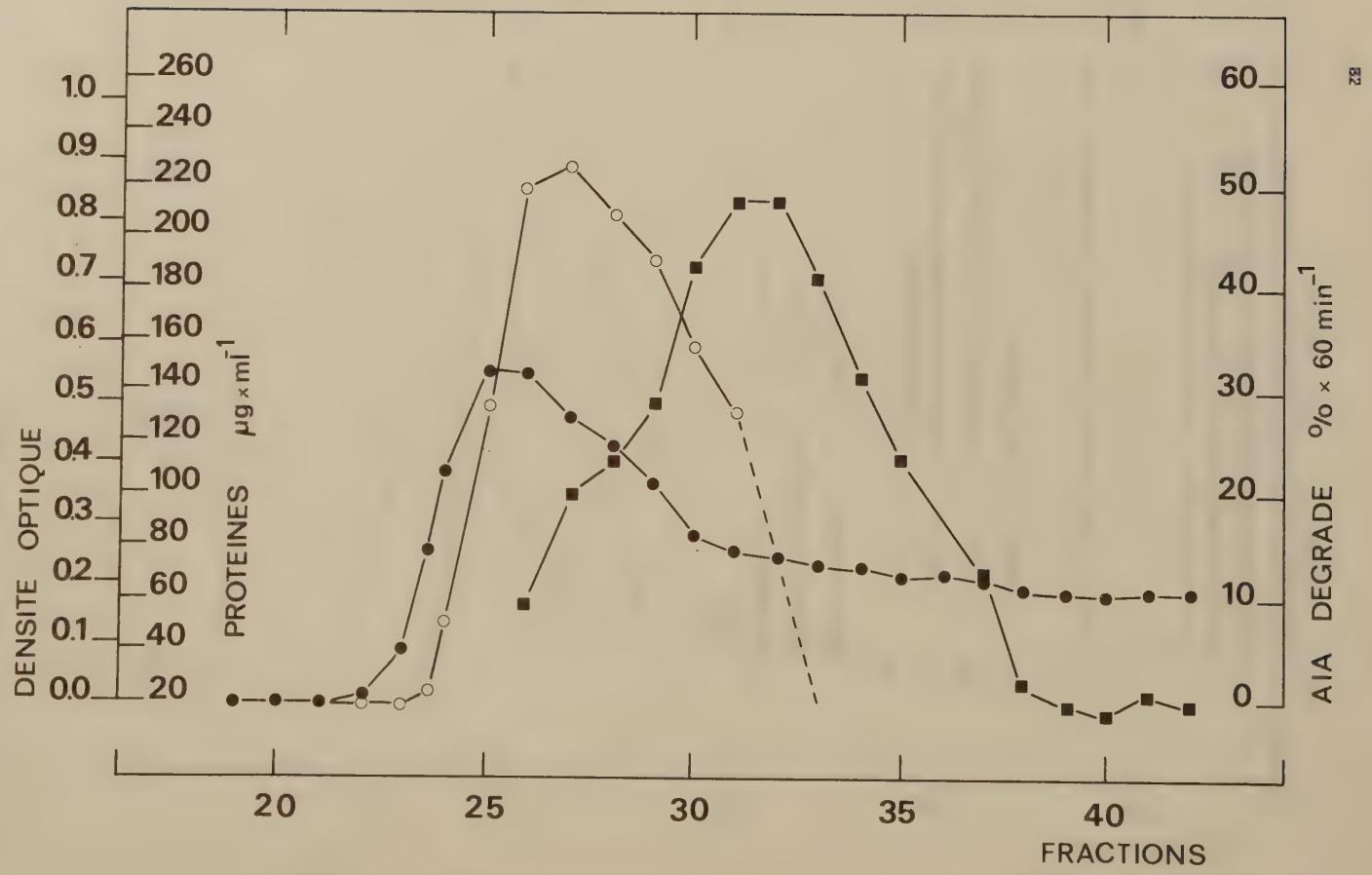

DENSITE OPTIQUE
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
PROTEINES µg × ml⁻¹
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
AIA DEGRADE %o × 60 min⁻¹
60
50
40
30
20
10
0
20
25
30
35
40
FRACTIONS

Figure 6 : Diagramme d' élution sur Sephadex G 100 des auxines-oxydase et des protéines d'un extrait de 500 mg (PS) de cals MB lyophilisés.

L'extrait a été purifié au préalable sur Sephadex G 25.

—●— : DO à 254 nm.

—○— : concentration en protéines en µg / ml

—■— : activité AIA-oxydasique en % d' AIA dégradé par heure.

Débit d' élution : 24 ml / h.

Volume des fractions : 4.2 ml

Température : 4° C $\pm$ 0.5

En ce qui concerne l'activité auxines-oxydasique, on peut constater que l'activité de la souche S est inférieure à celle de la souche MB, ceci quel que soit le mode de calcul utilisé :

a) en considérant l'activité maximale au sommet du pic en % d' AIA dégradé / heure rapportée à la concentration en protéines de la fraction correspondante.

b) en rapportant l'activité AIA-ox moyenne à la moyenne des teneurs en protéines des fractions actives.

c) en rapportant l'activité AIA-ox moyenne à la teneur totale en protéines de l'extrait.

Tableau 4. Activité AIA-oxydasique d'extraits purifiés sur Sephadex G 100 de cellules S et MB fraîches et lyophilisée.

	lyophilisé		frais	
	S	MB	S	MB
a	21.2	43.8	--	28.4
b	12.3	23.1	--	28.1
c	1.5	2.6	--	2.2

a, b, c : modes de calculs (voir texte)

Les valeurs obtenues par ces trois méthodes sont reportées dans le tableau 4. Elles sont toujours plus faibles dans le cas de la souche S que pour la souche MB.

Des calculs d'activité effectués à partir de cinétiques de formation du méthylène-oxindole au cours du temps semblent confirmer ce résultat. Nous ne les reporterons pas cependant car nous n'avons pas pu obtenir une reproductibilité acceptable des différences.

4.3.1.4. Effet de la lyophilisation.

Pour faciliter la planification de nos expériences, nous avons cherché à conserver le matériel biologique. Il est évident que cette conservation ne devait pas altérer les propriétés physiologiques étudiées.

Nous avons donc essayé de conserver les cultures à basse température, dans un état de complète déshydratation, par le procédé de la lyophilisation.

A cet effet, les cals sont tout d'abord effrités en fragments de 1-2 mm, puis congelés très rapidement dans de l'azote liquide (-196° C). La sublimation de la glace se fait sous un vide poussé (0.02 torr) (Rey 1960). Le matériel lyophilisé est conservé dans un récipient hermétique au congélateur à -25° C.

En observant les diagrammes d'élution des fig. 5 et 6 réalisés à partir de cals d' Acer lyophilisés, on constate, pour la souche MB un décalage du pic d'activité auxines-oxydasique par rapport au pic de protéines dosées par la réaction de Folin. Ce décalage ne se produit pas dans la souche S. Un extrait MB obtenu à partir de matériel frais ne possède pas cette particularité (voir fig. 7).

Cette dérive du pic AIA-ox de la souche MB conduit aux conclusions suivantes :

a) le PM moyen du complexe auxines-oxydasique est plus faible

b) cette diminution de PM est provoquée par la lyophilisation et la conservation du matériel végétal.

Il est bien connu que plusieurs enzymes sont capables de détruire l'AIA, en particulier certaines peroxydases et les polyphénols-oxydases (voir 4.3.1.6.). Par conséquent, l'activité AIA-ox reportée sur la figure 7 (matériel frais) représente probablement la résultante des activités de plusieurs enzymes. De plus, la largeur du pic des AIA-ox observé dans ce cas semble indiquer qu'il est en fait constitué d'un mélange de protéines qui ne se séparent pas sur Sephadex G 100.

Au cours de la lyophilisation et de la conservation du matériel, certaines enzymes de PM élevé pourraient être dénaturées. Le pic plus étroit observé dans le cas du matériel lyophilisé (figure 6) serait alors constitué d'enzymes de PM plus faible, mais possédant encore une activité AIA-ox.

A partir des diagrammes d'élution, il est possible de déterminer le poids moléculaire d'une substance éluée sur Sephadex, connaissant le volume d'exclusion V_o de la colonne, et le volume d'élution V_e de la substance, selon la formule donnée par Determann (1969) pour du Sephadex G 100 :

$$\log PM = 5.941 - 0.847 \ (V_e / V_o)$$

Pour la souche S lyophilisée, V_e = 15 fractions $\pm$ 1

V_o = 9 fractions

Pour la souche MB lyophilisée, V_e = 20 fractions $\pm$ 1

V_o = 9 fractions

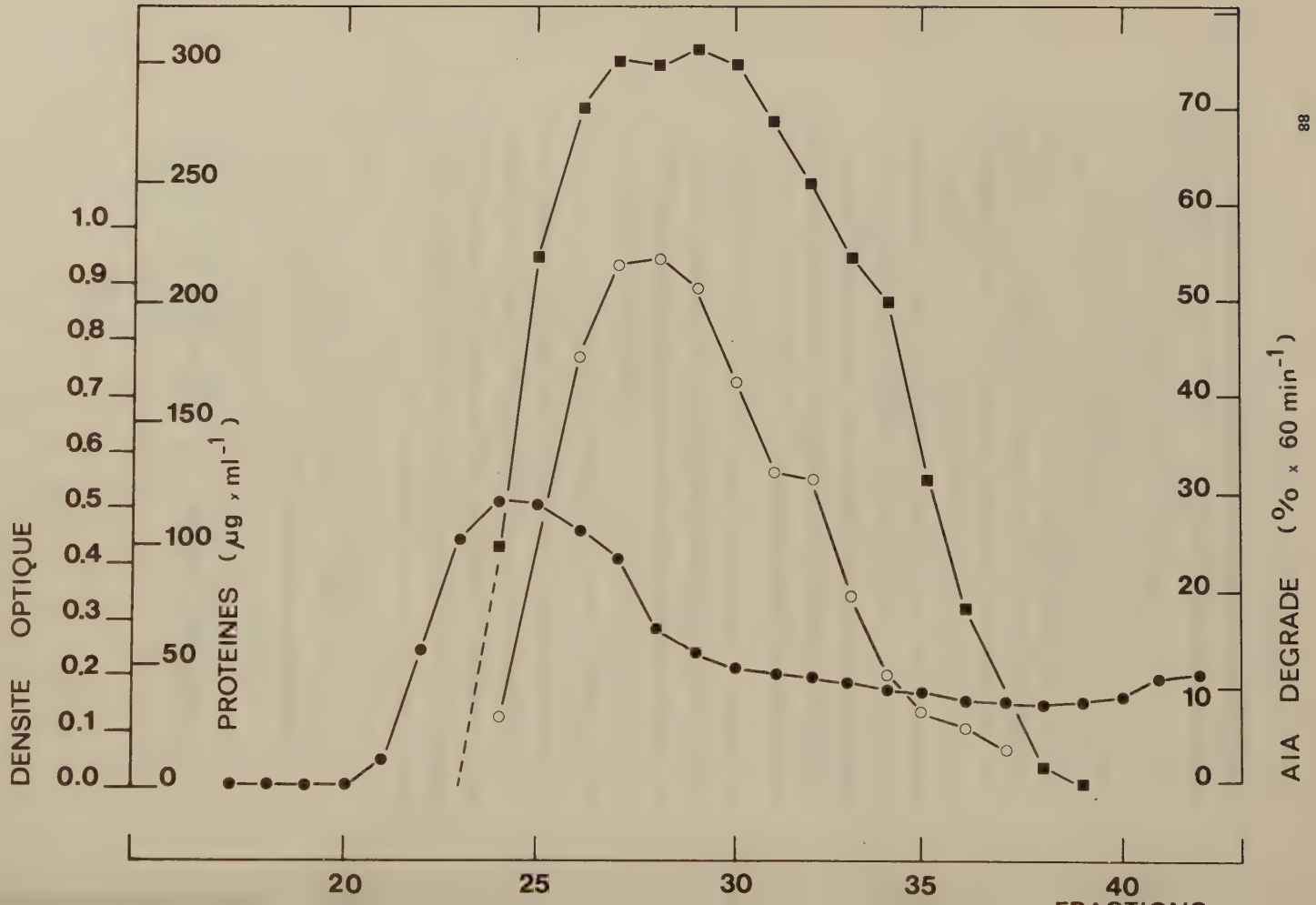

DENSITE OPTIQUE
PROTEINES (µg x ml-1)
AIA DEGRADE (% x 60 min-1)
FRACTIONS
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
0
50
100
150
200
250
300
0
10
20
30
40
50
60
70
20
25
30
35
40

Figure 7 : Diagramme d' élution sur Sephadex G 100 des auxines-oxydase et des protéines d'un extrait de 5 g.(PF) de cals MB frais.

L'extrait a été purifié au préalable sur Sephadex G 25

—●— : DO à 254 nm

—○— : concentration en protéines en µg/ml

—■— : activité AIA-oxydasique en % d' AIA dégradé par heure.

Conditions : voir figure 6.

En remplaçant V_e et V_o par leurs valeurs dans la formule ci-dessus, on obtient :

$$\text{PM AIA-ox (S)} : 33'800 \pm 5'000$$
$$\text{PM AIA-ox (MB)} : 11'400 \pm 3'000$$

Pour la souche MB non lyophilisée, V_e = 16 fractions $\pm$ 1

V_o = 9 fractions $\pm$ 1

ce qui correspond à un PM de 27'200 $\pm$ 5'000

Le poids moléculaire du complexe auxines-oxydasique intact correspond à celui trouvé par Lavanchy (1970) pour les peroxydases de la racine de Lens et par Sevhonkian (1972) pour les polyphénols-oxydases du même matériel. Ces deux types d'enzymes possèdent une activité AIA--oxydasique (Tomaszewski 1959, Leopold et Plummer 1961).

Nous pouvons, dès lors, supposer que ces deux enzymes seraient détruites par la lyophilisation, dans les cultures d' Acer.

Lavanchy (1970) a étudié l'effet de la lyophilisation sur l'activité AIA-ox d'extraits bruts et purifiés. Il a constaté que l'activité n'était pas modifiée sensiblement par le procédé, mais que les cofacteurs naturels présents dans l'extrait brut disparaissaient complètement. En rajoutant des cofacteurs phénoliques tels que l'acide p-coumarique, l'activité était restaurée.

4.3.1.5. Cinétiques des AIA-ox en fonction de la concentration en substrat et en cofacteurs.

Après purification partielle sur Sephadex G 25 et G 100 et concentration des fractions actives par ultra-filtration, nous disposions d'un extrait auxines-oxydasique hautement actif.

Il nous a paru intéressant d'étudier l'allure des courbes de cinétique enzymatique de cet extrait grâce à l'absorption du méthylène-oxindole formé au cours de la réaction. Les cofacteurs testés sont l'acide p-coumarique (cofacteur phénolique) et le $MnCl_2$.

Le pH de la solution réactive est maintenu à 6.1 par du tampon phosphate 1/15 M ; en effet, des essais à pH 5 n'ont montré aucune activité.

La force ionique, dont dépend la formation du méthylène-oxindole est maintenue constante pour chaque essai par du NaCl 0.25 M. L'extrait provient d'une souche MB non lyophilisée.

a) Concentration optimale en AIA.

Les concentrations en AIA et en acide p-coumarique (ACPC) ont été testées simultanément, mais elles seront reportées séparément ici pour des raisons de clarté.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

ACPC : 10^{-5} M

$MnCl_2$: 10^{-4} M

conc. en protéines : 45 µg/3ml de milieu d'incubation.

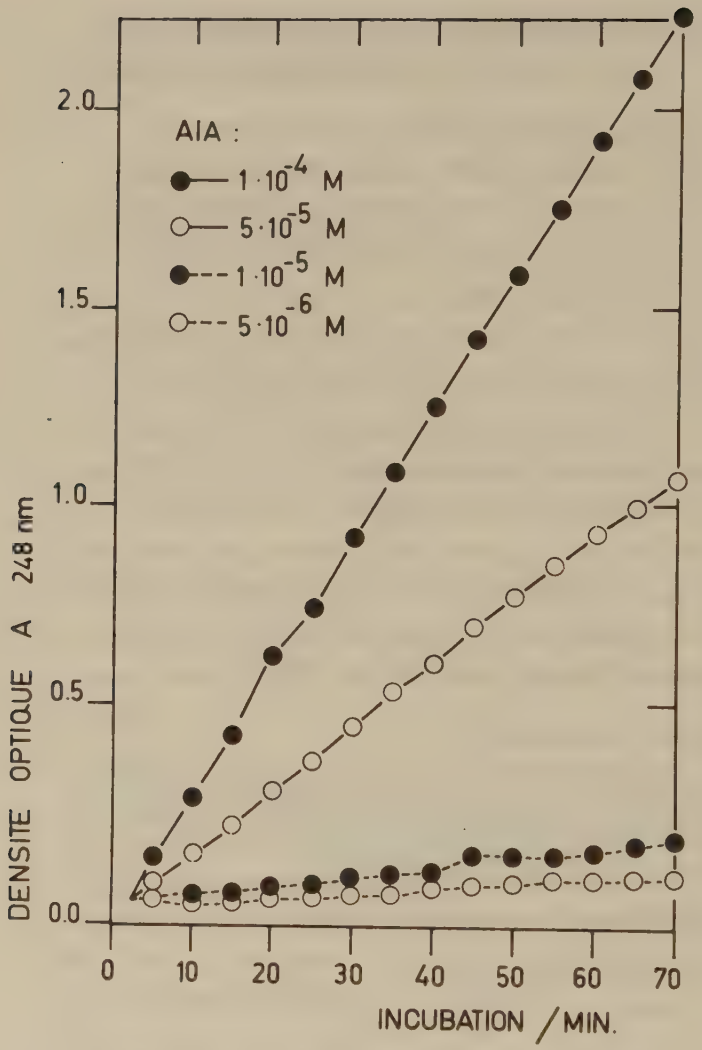


Figure 8 : Concentration optimale en AIA pour l'activité auxines-oxydasique.

Extrait purifié de 5 g. de cellules MB fraîches.

Conditions : ACPC : 10^{-5} M ; $MnCl_2$: 10^{-4} M ; pH : 6.1

Teneur en protéines de l'extrait : 15 µg/ml.

La figure 8 montre que, pour l'incubation donnée, la variation de densité optique initiale est maximale pour une concentration 10^{-4} M, dans les limites testées (5×10^{-6} à 10^{-4} M).

De plus, on peut dire que cette concentration n'est pas supraoptimale, puisque les variations de DO après 60 minutes pour des concentrations d' AIA de 5×10^{-5} et 10^{-4} M sont encore proportionnelles.

Dans les gammes de concentrations étudiées, nous n'avons pas observé de période de latence.

b) Concentration optimale en acide p-coumarique.

Les raisons pour lesquelles nous avons employé l'acide p-coumarique (ACPC) comme cofacteur phénolique plutôt que le 2,4-dichlorophénol (DCP) ont été déjà discutées sous 3.1.2.4. Lescure (1970b) a réalisé une étude similaire sur des extraits enzymatiques d' Acer S ou MB, purifiés sur colonne d'échangeur d' ions, en présence de différentes concentrations de DCP. Elle relève un effet coopératif du DCP avec l'enzyme MB, alors qu'avec l' enzyme S, cet effet n'existe pas. D'autre part, l' urée supprime cet effet à une concentration de 3.6 M.

La figure 9 illustre l'effet de différentes concentrations d' ACPC sur l'augmentation de densité optique à 248 nm. Nous n'avons reporté ici que les deux concentrations d' AIA les plus favorables à l'activité d' AIA-ox (voir fig. 8).

On remarque que la concentration optimale en ACPC est de 10^{-5} M, aux deux taux d' AIA présentés. Des concentrations plus élevées entraînent une rapide inhibition. Cette inhibition par des hautes concentrations en ACPC a été décrite comme un phénomène général par Tomaszewski (1964).

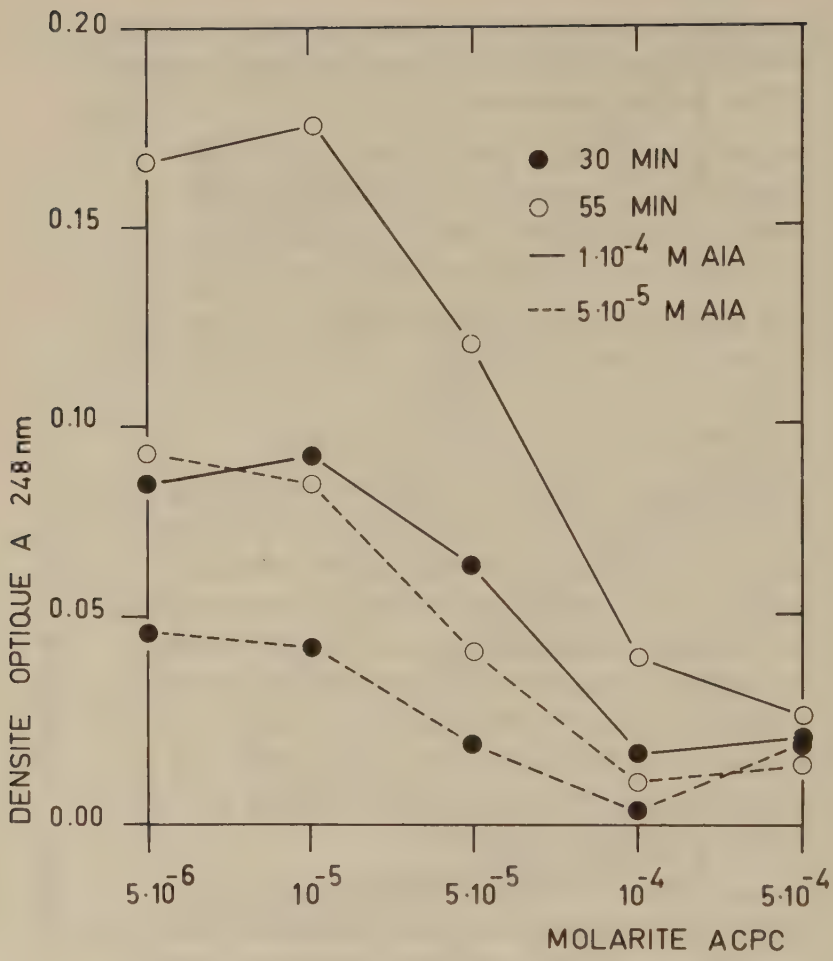


Figure 9 : Concentration optimale en ACPC pour l'activité auxines-oxydasique.

Extrait purifié de 5 g. de cellules MB fraîches.

Conditions : AIA : 10^{-4} M ; $MnCl_2$: 10^{-4} M ; pH : 6.1

Teneur en protéines de l'extrait : 15 µg/ml.

c) Concentration optimale en $MnCl_2$.

L'effet activateur de l' ion Mn^{++} sur la dégradation de l' AIA a été mis en évidence en 1950 par Wagenknecht et Burris. Ces auteurs remarquent également que selon la concentration ou la nature de l' extrait, ce cofacteur peut également développer une action inhibitrice.

Gaspar et Dinant (1967) confirment, sur des extraits de racines de Lens, l'existence d'interactions entre le manganèse et le DCP, révélée par Pilet (1957). Le $MnCl_2$ lève l' inhibition due à des doses élevées de DCP, agissant dans ce cas sur l' interconversion des phénols (Van Sumere et al. 1959).

De semblables interactions existent vraisemblablement entre l' ACPC et le $MnCl_2$, mais, à notre connaissance, elles n'ont pas été étudiées de manière aussi approfondie. Pilet et al. (1967) relèvent cependant que l' adjonction de $MnCl_2$ en présence d' ACPC modifie le pH optimum des auxines-oxydases du Lens.

L' essai a été réalisé dans des conditions identiques à celles décrites sous 4.3.1.5. (a).

La figure 10 démontre que jusqu'à 10^{-4} M, le $MnCl_2$ a un effet d'accélération significatif. Même à des concentrations faibles de $MnCl_2$ (10^{-6} M), aucune phase de latence n'a été décelée.

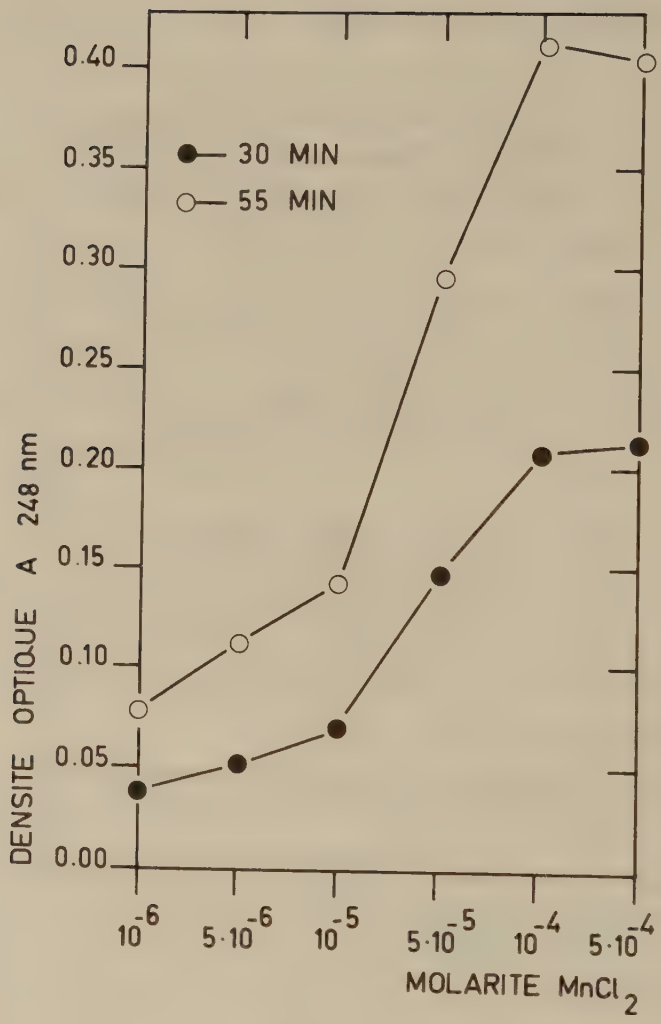


Figure 10 : Concentration optimale en $MnCl_2$ pour l'activité auxines-oxydasique.

Extrait purifié de 5 g. de cellules MB fraîches.

Conditions : ACPC : 10^{-5} M ; AIA : 10^{-4} M ; pH : 6.1

Teneur en protéines de l'extrait : 15 µg/ml finaux.

4.3.1.6. Observations.

En conclusion, les extraits d' Acer S et MB possèdent une activité auxines-oxydasique qui ne peut être mise en évidence que par élimination d' inhibiteurs naturels (filtration sur Sephadex).

Le complexe auxines-oxydasique de la souche S est plus stable à une cryodessication que celui de la souche MB. Le poids moléculaire global du complexe des deux souches est semblable et correspond à celui d' enzymes possédant une activité auxines-oxydasique, telles que les peroxydases ou les polyphénoloxydases. Lors d' une lyophilisation, le PM du complexe MB diminue de moitié sans perte d'activité. Cette diminution de PM pourrait être due à une décomposition de certaines protéines du complexe en sous-unité de PM plus faible. Sequeira et Mineo, en 1966, séparent trois groupes d'enzymes par chromatographie d'échange d' ions sur DEAE-Sephadex. Un de ces groupes possède à la fois une activité auxines-oxydasique et une activité peroxydasique ; le second une activité peroxydasique élevée et AIA-oxydasique faible et le troisième une activité AIA-ox très forte et peu ou pas d'activité peroxydasique.

Ces auteurs pensent que les échecs dans la séparation de l' AIA-ox et de la peroxydase sont dûs à ce que les enzymes forment des agrégats protéiniques et sont intimement associées.

On pourrait admettre que lors d'une lyophilisation, ces agrégats soient partiellement dissociés, entraînant ainsi une perte de poids moléculaire de la fraction active.

Cependant, les mêmes auteurs constatent qu'en lyophilisant un extrait brut, l'activité auxines-oxydasique est perdue, alors que l'activité peroxydasique n'est pas modifiée.

Rappelons que dans notre cas, où le matériel est lyophilisé avant l' extraction, l'activité auxines-oxydasique n' est pas touchée.

4.3.2. Activité AIA-ox "in vivo".

4.3.2.1. Avant-propos.

Les expériences présentées au paragraphe précédent indiquent une différence d' activité auxines-oxydasique entre les deux lignées cellulaires. Cependant, on peut se demander si les activités observées ont une réalité physiologique "in vivo" d'une part, et si les différences ne sont pas dues à des rendements d' extraction dissemblables dans les deux souches, d'autre part.

Pour répondre à ces questions, nous avons entrepris une étude de l' activité AIA-ox de cellules intactes, que nous avons appelée "étude in vivo".

Les cellules S ou MB , prélevées après 12 jours de culture sont lavées et remises en suspension dans du milieu de culture frais. Le nombre de cellules est déterminé sur une prise aliquote de la suspension. Les cellules sont alors mises en présence d' AIA-1-^{14}C (carboxyl $^{-14}$C). Si une dégradation de l' AIA intervient, du $^{*}CO_2$ radioactif sera émis en même temps que le CO_2 respiratoire. Celui-ci, récupéré dans du KOH, permettra une évaluation de l' activité AIA-ox.

Le principe de l' essai ainsi que les voies métaboliques conduisant à une décarboxylation ont déjà été discutées sous 3.1.3.1.

Il était important dans ce type d' essai de vérifier que, pendant la durée de l' expérience au moins, aucune activité AIA-ox n'apparaissait dans le milieu d' incubation.

Zenk et Müller (1963), étudiant la décarboxylation de l' AIA-1-^{14}C par des fragments de coléoptiles d' Avena selon une méthode semblable, prennent soin d' isoler la partie coupée du fragment par du collodion. En effet, Briggs et al. (1955) démontrent que les résultats obtenus sur l' activité AIA-ox "in vivo" sont très souvent dûs à un artefact causé par les surfaces de coupe, susceptibles de laisser diffuser des enzymes dans le milieu d' incubation.

Le problème de l' exodiffusion d' enzymes par des cultures cellulaires a été soulevé à maintes reprises (Straus et Campbell 1963, Yamaoka et al. 1969). Straus et Campbell démontrent que les auxines-oxydases sont capables de diffuser dans l'eau ou dans du $CaCl_2$ 0.05 M. Un rinçage à l'eau des cultures entraîne une diminution de l' activité enzymatique dans le milieu de diffusion.

Dans le cas des cellules d' Acer, une activité auxines-oxydasique dans le milieu de culture a pu être notée, lorsque le milieu de Lamport était utilisé. Cependant, cette activité ne devient décelable qu' après au moins 5 jours de culture. Dans le milieu de Stuart et Street par contre, aucune activité n'a pu être observée.

Le fait que les AIA-ox soient relâchées dans le milieu de Lamport et non dans le milieu de Stuart et Street pourrait avoir une relation avec les perturbations de la formation de la paroi cellulaire, induites par la croissance en culture (Yamaoka et al. 1969).

Si nous comparons, dans les milieux de Lamport modifié et de Stuart et Street (voir 2.2.1.), les concentrations en éléments susceptibles d' influencer le biosynthèse des parois, nous constatons tout d'abord que le myo-inositol, un des précurseurs importants de cette synthèse, est absent du milieu de Lamport.

La teneur en Ca^{++} est à peu près équivalente, mais le milieu de Lamport contient de l' EDTA, puissant chélateur du calcium.

D'autre part, la kinétine est absente du milieu de Lamport. Nous ne savons pas, de plus, quelles répercussions peut avoir l' absence de certaines vitamines (ac. pantothénique, choline) et le faible taux en composés azotés du milieu de Lamport.

Ces différences pourraient, dans une certaine mesure, permettre d' expliquer l' absence de diffusion dans le milieu de Stuart et Street.

Cependant, dans tous nos essais, nous avons testé l' activité de décarboxylation d'un filtrat de culture (milieu conditionné) et du milieu frais.

4.3.2.2. Résultats.

Le tableau 5 montre la quantité d' AIA dégradé par heure dans les deux souches S et MB, ramenée à une densité cellulaire de 10^5 cellules / ml de milieu d'incubation. La concentration de l' AIA est de 6×10^{-6} M, la radioactivité spécifique dans la fiole est de 6.85 mCi/mmole. Le rendement du comptage par scintillation liquide a été estimé à 80 % par du toluène-^{14}C, compte tenu du quenching dû au KOH. La décarboxylation réalisée par des filtrats de cultures S et MB est négligeable. Le bruit de fond (BG) a été déduit des cpm figurant sur ce tableau.

Tableau 5 : Décarboxylation de l' AIA par des suspensions cellulaires intactes S et MB

Souche S			Souche MB		
cpm	nb cell x 10^{-6}	nmoles CO_2 /10^6 cell	cpm	nb cell x 10^{-6}	nmoles CO_2 /10^6 cell
18'480	3.182	0.482	20'728	1.789	0.961
10'220	2.970	0.285	4'464	0.765	0.484
5'165	2.970	0.144	6'588	0.765	0.714

D'après ce tableau, on peut conclure que, dans les trois essais présentés ici, la décarboxylation est plus forte lorsque des cellules MB sont mises en présence d' AIA* que lorsque des cellules S sont incubées.

D'autre part, les deux souches ne laissent pas diffuser d'auxines-oxydases dans le milieu de culture comme le démontrent les témoins contenant le milieu conditionné. En faisant le rapport des nmoles d' AIA dégradées par la souche MB sur les nmoles dégradées par la souche S, on voit qu'il est voisin de 2 pour les deux premiers essais et de 5 pour le 3ème essai. La non-reproductibilité de ce rapport est discutée dans le paragraphe suivant.

4.3.2.3. Observations.

Malgré une standardisation poussée de nos essais, concernant notamment l' âge de la culture, la température et la durée de l' équilibration et de l' incubation, il n'a pas été possible d' obtenir des résultats reproductibles du point de vue quantitatif (nb. de µmoles d' AIA dégradé par exemple).

Ce phénomène, d'ailleurs courant lors de l'étude de matériel en culture, peut s' expliquer partiellement par les faits suivants :

- entre deux répétitions d' une même expérience, les cellules ont subi un certain nombre de modifications, en particulier au cours du repiquage. Si bien qu' en prélevant des cellules après une même durée de culture, mais ayant subi un ou plusieurs repiquages, on ne peut pas être absolument certain que leur intégrité physiologique n'a pas été modifiée. Il a en effet été démontré (Dorée et al. 1972) que la simple ouverture

d' une fiole de culture, et à plus forte raison le repiquage, provoquait un bouleversement considérable du métabolisme des cellules et de leur perméabilité à certains composés (adénine, leucine). La concentration de quelques ions ou métabolites peut également subir un brusque changement. Il n'est dès lors pas exclu de prétendre que ces modifications aient une répercussion sur le devenir des cellules transférées et que ces répercussions ne soient pas identiques pour les deux fioles de culture.

D'après nos essais, nous pouvons considérer que la décarboxylation est un phénomène très dépendant de l' état de la culture. Néanmoins, la comparaison entre les deux souches peut se faire, les valeurs observées variant toujours dans le même sens, et restant significativement différente.

4.3.3. Produits de dégradation de l' AIA*.

4.3.3.1. Avant-propos.

Lors de l' incubation de cellules intactes d' Acer avec de l' AIA, nous avons pu constater qu'une fraction de l' AIA introduit était décarboxylée. Nous nous sommes demandés d'une part quel était le devenir de l' AIA qui a pénétré, mais n'a pas été décarboxylé et, d'autre part, quels étaient les produits présents dans la cellule résultant de la décarboxylation de l' AIA.

Pour l' étude des produits n' ayant pas subi la décarboxylation, nous avons utilisé de l' AIA* radioactif marqué par du ^{14}C sur le groupe carboxyle. Ainsi, seuls les produits ayant conservé ce groupement seront radioactifs.

Pour l' étude des produits décarboxylés, nous avons fait appel à de l' AIA-2-^{14}C, marqué sur le groupe méthyle de la chaîne latérale. Ainsi, tous les produits résultant d' une ouverture du cycle ou d'une dégradation de la chaîne sur le carbone-1 seront marqués.

Avant d' aborder cette étude, nous avons tenu à contrôler la pureté de l' AIA-1 et -2-^{14}C reçu du fournisseur.

Il est connu en effet que l' AIA synthétique contient quelques impuretés dues soit à sa dégradation au cours du stockage, soit à des résidus de synthèse non éliminés. Collet et al. (1964) ont étudié la pureté des solutions stock d' AIA* et ont trouvé trois impuretés radioactives principales.

Nous avons voulu connaître la fraction d'impuretés radioactives par rapport à l' AIA, présentes dans les solutions stock que nous utilisions. Il était en effet important de ne pas pouvoir confondre ces impuretés avec les éventuels métabolites que nous désirions mettre en évidence.

10 µl d' AIA-1-^{14}C sont déposés sur une plaque de silicagel. Sur la même tache, on dépose encore 10 µl d' AIA non marqué à une concentration de 500 µg/ml. La migration a lieu dans le solvant AMIN sur 10 cm.

La plaque est découpée en fractions de 0.5 cm et chaque fraction est comptée par scintillation liquide dans le mélange toluène-alcool-Omnifluor.

La figure 11 (A) représente le radiochromatogramme obtenu. On ne note que très peu d'impuretés radioactives. La principale, à Rf 0.15, ne représente que le 7.5 % de la radioactivité totale.

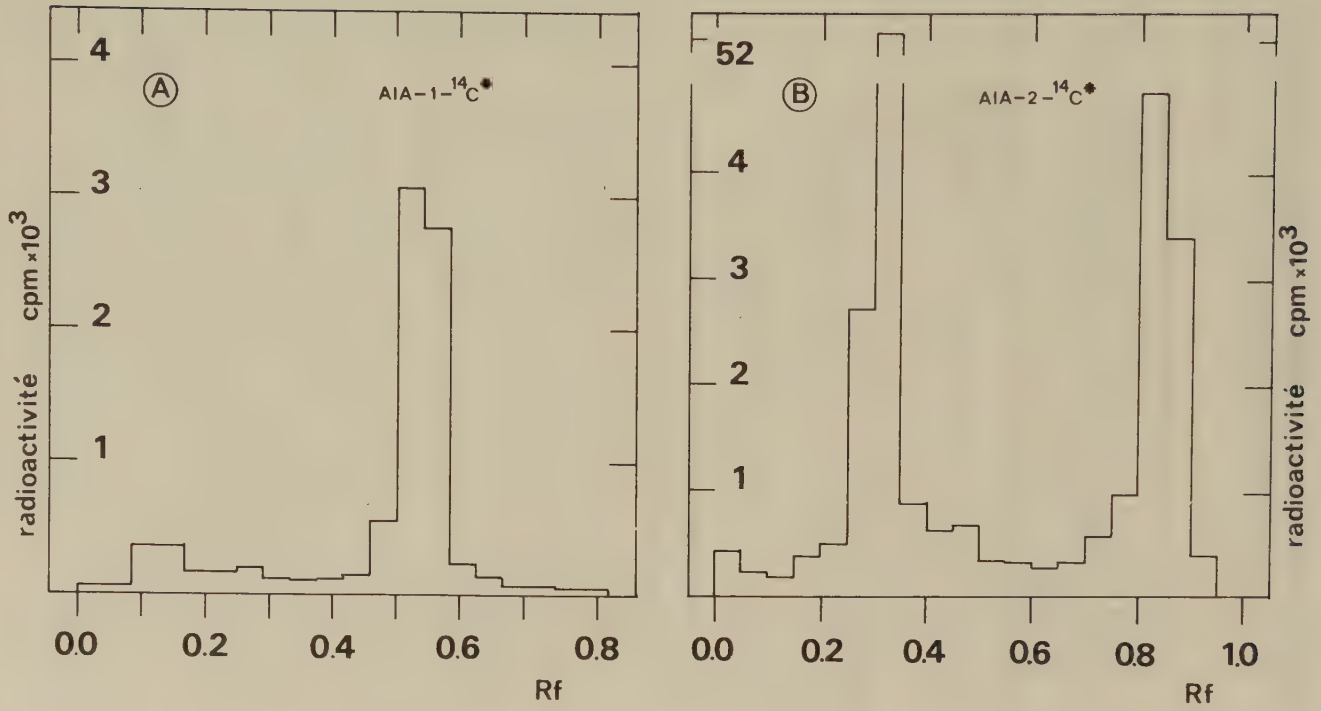

A
AIA-1-$^{14}C^{*}$
radioactivité cpm ×10^{3}
4
3
2
1
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
Rf
B
AIA-2-$^{14}C^{*}$
52
4
3
2
1
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Rf
radioactivité cpm ×10^{3}

Figure 11 A et B : Radio-chromatogrammes des solutions-stock d'AIA-1-^{14}C et d'AIA-2-^{14}C.

(A) : 10 µl (0.02 µCi) AIA-1-^{14}C. Radioactivité spécifique : 50 mCi/mmole

(B) : 25 µl (0.05 µCi) AIA-2-^{14}C. Radioactivité spécifique : 50 mCi/mmole.

Migration dans le solvant AMIN.

Révélation des standards par le réactif de Salkowski.

Le même contrôle a été effectué avec l' AIA-2-^{14}C. 25 µl (0.1 µCi) d' AIA-2-^{14}C ont été déposés sur la plaque de chromatographie.

Le radiochromatogramme obtenu est représenté sur la figure 11 (B). On note ici une impureté très visible à Rf 0.90, qui représente le 13.5 % de la radioactivité totale. Cette impureté est probablement du scatole (Rf 0.90, Collet et al. 1964), produit de dégradation spontané de l' AIA. (Pilet et Gaspar 1968).

Le % d'impuretés ne semble pas augmenter au cours de la conservation de l' AIA* en solution dans l' acétonitrile, indiquant que celles-ci sont déjà présentes dans le produit livré par le fournisseur.

4.3.3.2. Etude avec l' AIA-1-^{14}C.

Lors des expériences de décarboxylation (voir 4.3.2.) les cellules ayant incubé avec l' AIA-1-^{14}C* sont récupérées par filtration, lavées et les composés indoliques sont extraits selon la technique de Stowe et al. (1958)(voir sous 3.2.2.) Après chromatographie sur gel de silice dans le solvant AMIN (voir sous 3.2.3.), le chromatogramme est découpé en bandes de 0.5 cm, puis la radioactivité de chaque bande est déterminée par scintillation liquide.

Les chromatogrammes ainsi obtenus sont présentés dans la figure 12 (A) et (B). On note la présence de deux pics, l' un à Rf 0.35 et l' autre à Rf 0.75. Ces deux pics se retrouvent aux mêmes Rf dans chaque souche. Les pics de Rf 0.35 correspondent à l' AIA, comme le démontre la migration d' AIA standard (250 µg) à Rf 0.36. Le composé migrant à Rf 0.75 sera appelé pour l' instant "composé X".

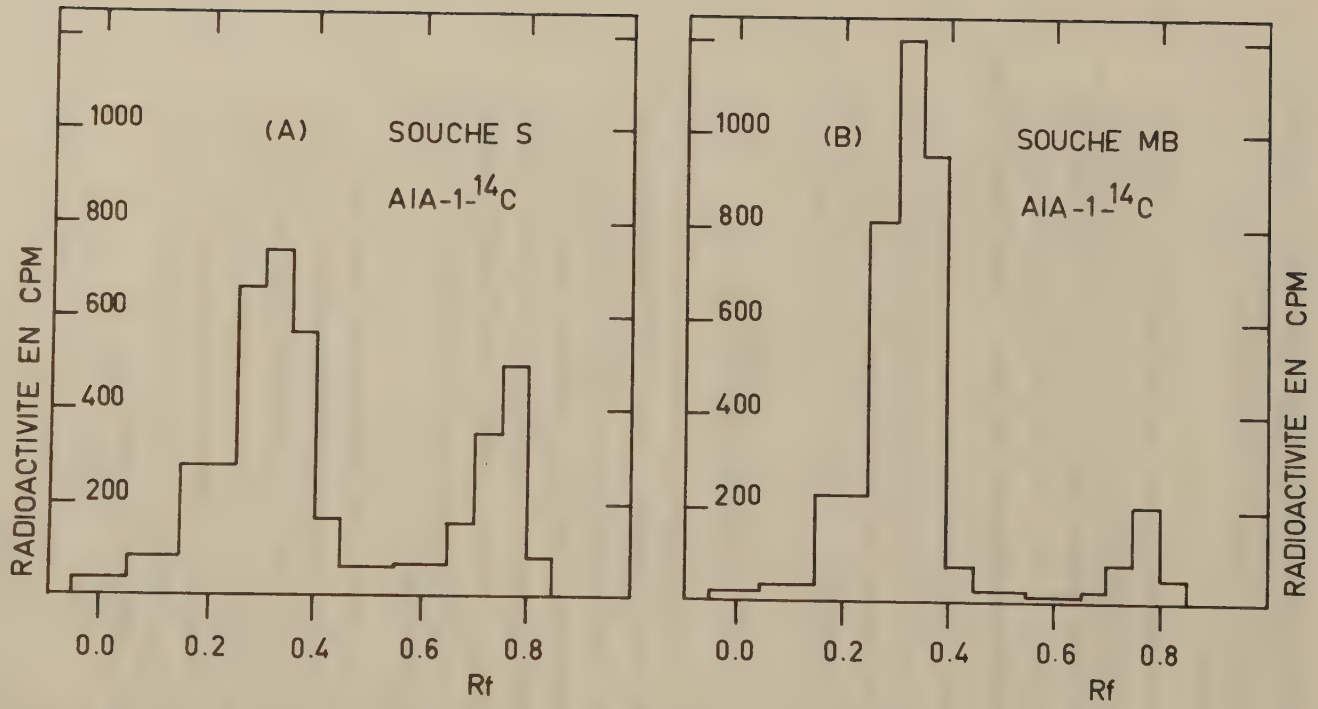


Figure 12 A et B : Radio-chromatogrammes d'extraits de composés indoliques totaux aprés incubation de cellules d'Acer avec de l'AIA-1-^{14}C.

(A) : souche S ; (B) : souche MB. Incubation : 1 h. à 27°C. Solvant : AMIN.

Si la nature du métabolite non décarboxylé de l' AIA-1-^{14}C est la même dans les deux souches, sa quantité relative est par contre très différente.

Dans le tableau 6, nous avons reporté la quantité de composé X en % de l' AIA (rapport R), pour trois essais différents dans lesquels les souches S et MB ont été analysées simultanément. Bien que les valeurs ne soient pas identiques dans les trois essais, (voir discussion sur la non-reproductibilité des valeurs expérimentales sous 4.3.2.3.), on constate que la souche S a toujours formé plus de composé X que la souche MB.

En comparant alors le taux en composé X dans S à son taux dans MB, on voit que le rapport est constant et égale environ 3. Par conséquent, on peut conclure que la souche S forme environ 3 fois plus de composé X que la souche MB, à partir de la même quantité d' AIA. Il semble en effet que la pénétration de l' AIA ne soit pas significativement différente dans les deux souches.

Une évaluation grossière de cette pénétration peut être effectuée en faisant la somme de la radioactivité émise sous forme de $*CO_2$ et de la radioactivité totale retrouvée sur la chromatographie. En exprimant cette somme en % de la radioactivité introduite et en ramenant la valeur obtenue à une densité cellulaire de 10^6 cellules/ml, on a une estimation du taux de pénétration. Bien entendu, les valeurs sont loin d' être exactes, puisqu'elles ne tiennent pas compte, entr'autres, des pertes lors de la chromatographie (dégradation) et de la récupération des bandes de silice. Cependant, le rendement de l'extraction, mesuré par l' indice colorimétrique de l'extrait après une surcharge d' AIA froid, a été pris en considération lors du calcul.

Quelques valeurs obtenues sont reportées dans le tableau 7.

Tableau 6 : Quantité de composé X par rapport à l' AIA présente dans des cellules incubées avec de l' AIA-1-^{14}C.

Essai No	R (souche S)	R' (souche MB)	R / R'
1	75.4	21.8	3.46
2	55.0	17.0	3.26
3	51.3	16.4	3.13

$$R = \frac{\text{radioactivité dans le composé X}}{\text{radioactivité dans AIA}} \times 100$$

Conditions d' incubation : voir 3.2.

Tableau 7 : Pénétration de l' AIA* dans les cellules d' Acer

Souche S	Souche MB
5.52	6.28
6.71	5.61

Conditions de mesure et calcul : voir texte.

4.3.3.3. Etude avec l' AIA-2-^{14}C.

Le même essai a été répété avec de l' AIA* marqué dans le groupement méthyle de la chaîne latérale, afin de mettre en évidence les produits résultant de la décarboxylation de l' AIA.

En examinant les radiochromatogrammes de la figure 13 (A) et (B), on constate que des résultats identiques à ceux de l' AIA-1-^{14}C sont obtenus. A part le pic de l' AIA, seul le composé X est présent. On peut donc en conclure qu'il n'y a pas de produits décarboxylés dans la cellule.

Comme précédemment, la quantité de composé X est plus élevée dans la souche S que dans la souche MB.

Nature probable du composé X.

Nous avons alors tenté d'identifier le composé X. Nous savons que ce composé possède le carbone 1 de la chaîne latérale et migre à un Rf de 0.70 - 0.80 dans le solvant AMIN.

Parmi les composés indoliques possédant ces propriétés, nous avons plus spécialement testé l' indolylacétonitrile (IAN), l' indolylacétaldéhyde (IAAld) et l' indolylacétamide (IAAm). Dans le solvant AMIN, seule l' IAAm migrait à un Rf comparable à celui du composé X (0.70 - 0.80).

Nous avons vérifié, avec d' autres mélanges de solvants, que l' IAAm co-chromatographiait toujours avec le composé X . Trois mélanges de solvants ont été utilisés :

A : isopropanol - ammoniaque - eau (10 : 1 : 1) ,

B : acétate de méthyle - isopropanol - ammoniaque (45 : 35 : 20) et

C : chloroforme - acide acétique (95 : 5) en atmosphère d' azote.

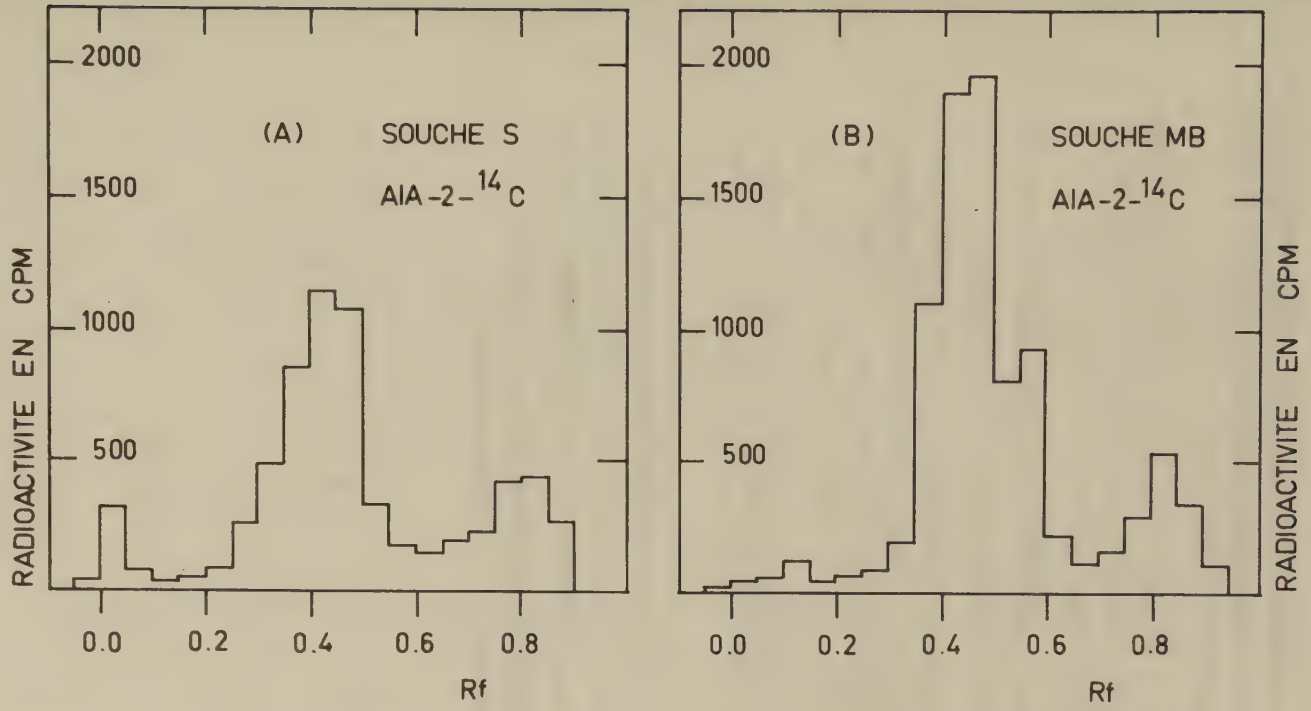


Figure 13 A et B : Radiochromatogrammes d'extraits de composés indoliques totaux après incubation avec de l'AIA-2-^{14}C.

(A) : souche S ; (B) : souche MB ; incubation : 2 h. à 27^{0}C. Solvant : AMIN.

L'examen du tableau 8 montre que les Rf des standards d' AIA et d' IAAm ne diffèrent pas significativement des Rf de l' AIA et du composé X de l' extrait.

On peut donc en conclure que le composé X est très probablement de l' IAAm, en restant cependant conscient que la comparaison des Rf est une méthode relativement grossière.

Afin de contrôler cette affirmation, nous avons analysé le composé X par chromatographie en phase gazeuse.

Les taches de la chromatographie sur couche mince correspondant à l' AIA et à l' IAAm ont été récupérées quantitativement extraites par du chloroforme, puis silylées. De l' AIA et de l' IAAm standard ont été silylées en même temps.

Les temps de rétention des standards coïncidaient avec ceux des extraits : AIA : 10.1 min., 190.5° C ; IAAm : 14.8 min., 209.3° C.

Bien que les substances isolées de la chromatographie sur couche mince (AIA et IAAm) ne soient pas très pures, les pics correspondant à l' AIA et à l' IAAm étaient cependant très nets.

Il n'est donc pas exclu, étant donné ce qui précède, que le composé X soit de la β-indolyl-acétamide.

Tableau 8 : Comparaison des Rf de l' AIA-2-^{14}C et de l' IAAm dans différents mélanges de solvants.

Cellules S	AIA		IAAm	
Solvant	St	Ex	St	Ex
A	0.28	0.28	0.57	0.63
B	0.28	0.28	0.68	0.73
C	0.24	0.23	0.03	0.03

Cellules MB : résultats identiques

St : standard. Ex : extrait

Erreur sur le Rf : $\pm$ 0.05

Mélanges de solvants : (A) : Isopropanol - Ammoniaque - Eau (10 : 1 : 1), (B) : Acétate de méthyle - Isopropanol - Ammoniaque (45 : 35 : 20), (C) : Chloroforme - Acide acétique (95 : 5).

4.3.3.4. Etude des produits de dégradation dans le milieu d'incubation.

L'analyse des produits du métabolisme de l' AIA-1- et -2- ^{14}C dans les cellules, a démontré qu'un seul composé se formait, identifié comme la β-indolyl-acétamide. Ce produit, non décarboxylé, ne rend pas compte de l' activité décarboxylative vue sous 4.3.3.2.

Les métabolites décarboxylés de l' AIA ne pouvant être mis en évidence à l'intérieur des cellules, nous avons tenté de les rechercher dans le milieu d'incubation.

Nous avons alors étudié la répartition de l' AIA-2- ^{14}C dans les cellules et dans le milieu d'incubation des deux souches S et MB simultanément. Les conditions expérimentales étaient donc rigoureusement identiques.

Les produits du milieu d'incubation ont été séparés en composés neutres, basiques, acides et hydrosolubles (Stowe et al. 1968). Nous n'avons pas tenté de déterminer la nature chimique des composés séparés. Seuls les composés acides ont été chromatographiés de manière à quantifier la fraction correspondant à de l' AIA.

Les résultats sont reportés dans le tableau 9. On voit immédiatement que le devenir de l' AIA est très différent dans les deux souches, bien que la pénétration soit la même. Après 2 heures d'incubation, le milieu ayant contenu la souche S ne renferme plus que 0.8 % d' AIA, alors que celui qui était en contact avec la souche MB en contient encore 28.2 %.

Tableau 9 : Répartition de la radioactivité après incubation de cellules S et MB avec de l'AIA-2-^{14}C, en % de la radioactivité initiale de l'AIA introduit.

	S	MB
Pénétration	9.7	9.5
Radioactivité totale dans le milieu	79.0	72.8
Composés :		
hydrosolubles	(59.4)	(22.9)
acides total	(5.8)	(37.7)
acides AIA	(0.8)	(28.2)
basiques	(1.8)	(1.8)
neutres	(8.8)	(8.0)
non-extractibles	(3.2)	(2.4)
Composés indoliques totaux dans les cellules	6.5	7.7
Récupération totale	88.7	82.3

Cette différence est due, principalement, à la formation de composés hydrosolubles, beaucoup plus importante chez S que chez MB. De plus, la fraction de composés acides représentant l' AIA est beaucoup plus faible chez S (14 %) que chez MB (75 %). Il ne s'agit donc pas uniquement d'une transformation de composés acides en composés hydrosolubles, mais encore d'un métabolisme différent de l' AIA. Il semble, si l'on compare la souche S à la souche MB, que deux phénomènes interviennent :

1) d'une part, l' AIA est transformé en composés hydrosolubles plus rapidement.

2) d'autre part, la transformation de l' AIA en d'autres composés acides est accélérée.

De ces résultats, on peut conclure que la concentration très faible en AIA dans le milieu d'incubation des cellules S est maintenue, alors qu'elle reste relativement élevée dans celui des cellules MB.

4.3.3.5. Observations.

Incubées avec de l' AIA, des suspensions cellulaires intactes d' Acer S ou MB forment des produits de dégradation dont un seul se retrouve dans le cytoplasme des cellules. Ce composé, identifié à de la β-indolyl-acétamide, après chromatographie dans le solvant AMIN, est présent dans les cellules à un taux plus élevé dans les cellules S que dans les cellules MB. Les autres produits de dégradation de l' AIA se trouvent tous dans le milieu d'incubation.

Deux hypothèses paraissent pouvoir être formulées à ce sujet :

a) les produits de dégradation, résultant de l'action du système auxines-oxydasique dans le cytoplasme de la cellule, seraient immédiatement rejetés dans le milieu extérieur, au fur et à mesure de leur formation.

b) le complexe auxines-oxydasique agirait à la périphérie de la cellule.

La première hypothèse ne résiste pas à une analyse critique plus poussée. En effet, quelle que soit la vitesse à laquelle les produits du métabolisme sont éliminés dans le milieu extérieur, une faible fraction devrait pouvoir être mise en évidence dans la cellule. Or, ce n'est jamais le cas. On est donc forcé d'admettre un mécanisme d'expulsion de ces produits quasi instantané, ce qui est très peu vraisemblable.

La seconde hypothèse, par contre, peut très bien rendre compte des phénomènes observés. Nous n'en garderons pour l'instant que l'énoncé, une plus large étude de sa vraisemblance étant réalisée sous 4.5.

A la lumière de cette hypothèse, analysons maintenant la valeur des estimations de la pénétration faites sous 4.3.3.2. Il est clair que les calculs de pénétration tels que nous les avons décrits ne tiennent pas compte du fait qu'une partie de l'AIA est dégradée avant de pénétrer dans la cellule. De plus, comme nous l'avons vu, l'intensité de cette dégradation est différente pour la souche S et la souche MB. En utilisant de l'AIA-1-^{14}C, il est possible de tenir compte de ce phénomène en mesurant le $^{*}CO_2$ radioactif dégagé. Encore faut-il admettre que tout l'AIA dégradé subit une décarboxylation.

Si l'on compare maintenant les quantités d' AIA non métabolisé restant soit dans la cellule, soit dans le milieu après l' incubation, on constate que, dans le cas de la souche S il y a peu d' AIA non dégradé, aussi bien dans la cellule que dans le milieu d'incubation. Dans la souche MB, par contre, le taux en AIA des cellules et du milieu est beaucoup plus élevé.

Ces différences prennent une importance considérable si l' on considère que la souche S nécessite un apport exogène d'auxine pour croître, alors que la souche MB peut se développer dans un milieu dépourvu d'auxine.

4.4. Produits conjugués de l' AIA.

4.4.1. Existence de produits conjugués.

4.4.1.1. Avant-propos.

Nous avons vu, sous 4.3.3., qu'un seul métabolite était formé lors de l' incubation de cellules d' Acer avec de l' AIA*. Ce produit a pu être identifié à la β-indolyl-acétamide. On ne rencontre dans la littérature que peu d' indications concernant l' indolylacétamide . Ce produit est, le plus généralement , considéré comme un intermédiaire dans la synthèse de l' AIA. En effet, des plantules de Choux incubées avec de l' IAAm-2-^{14}C forment de l' AIA (Riddle et Mazelis 1965). En faisant agir la peroxydase de Raifort sur du Tryptophane-^{14}C, Riddle et Mazelis (1964) ont démontré la formation d' IAAm. La peroxydase du Choux a un comportement comparable.

Chez les algues Furcellaria, l' IAAm joue également le rôle d'intermédiaire dans la synthèse de l' AIA, mais à partir de l' indolyl-acétonitrile (Schiewer et Libbert 1965, Schiewer, Krienke et Libbert 1967). Les auteurs précisent cependant que cette étape est caractéristique de leur matériel et n' est pas un cas général.

A notre connaissance, un seul cas dans lequel l' IAAm apparaît comme un produit de dégradation de l' AIA a été cité (Kutacek et Kefeli 1968). Ici encore, il s'agit de Brassicaceae qui présentent un métabolisme indolique différent des autres espèces, notamment à cause de l' élaboration de la glucobrassicine et de ses dérivés. La voie conduisant à l' IAAm est présentée comme un shunt métabolique dont le rôle n'est pas encore connu.

D'autre part, l'IAAm pourrait également être formée en dehors de tout matériel biologique. Zenk (1961) a pu démontrer que ce produit résultait de l' ammonolyse d' un ester glucosidique d' AIA, cette réaction d' ammonolyse ayant été mise en évidence en 1958 par Jepson sur l' acide β-indolylacétyl-glucosiduronique.

La liaison ester entre le glucoside et le groupement acétyl de l' AIA serait rompue par fixation d' un NH_2 sur l' AIA, libérant d'une part le sucre et d'autre part de l' IAAm. Cette réaction a même été utilisée comme méthode de dosage des conjugués glucosidiques d' AIA par Piskornik et Bandurski (1972). Après traitement de leur extrait à l'ammoniaque, ces auteurs isolent l' IAAm formée et en effectuent le dosage colorimétrique par le réactif de Salkowski.

Dans ces conditions, il est fort probable que l' IAAm observée dans nos essais soit en fait un produit de dégradation d' un conjugué glucosidique d' AIA, formé par ammonolyse lors de la chromatographie sur couche mince dans un solvant ammoniacal (AMIN).

4.4.1.2. Résultats.

Afin de détecter la présence éventuelle d'un conjugué glucosidique d' AIA dans nos extraits, des cellules S et MB âgées de 8 jours ont été incubées dans les conditions habituelles avec de l' AIA-1-^{14}C (conc. finale 5×10^{-5} M, activité spécifique 0.8 mCi / mmole). Après extraction, (voir 3.2.2.) des aliquotes de l' extrait sont déposées sur 4 plaques de silice. La première plaque est séparée sur AMIN (I) la deuxième sur CA (II) et les deux dernières (III et IV) sur CAEF (voir 3.2.3.b.).

Après migration, les plaques I, II et III sont fractionnées et la radioactivité de chaque zone estimée par scintillation liquide. Les radiochromatogrammes ainsi obtenus sont représentés sur les fig. 14 (A), (B) et (C).

La fig. 14 (A) (plaque I) révèle la présence d' AIA et d' IAAm, comme précédemment avec le solvant AMIN. La fig. 14 (B) révèle aussi deux composés, l' AIA à Rf 0.25 et un autre produit ne migrant pas (Rf = 0) qui pourrait très bien être un AIA-glu puisque la migration a eu lieu dans un solvant acide. Cependant l' IAAm migre également très peu dans ce solvant (Rf = 0.03) et ne peut par conséquent pas être distinguée de l' AIA-glu par cette méthode.

Dans le solvant à l'acide formique (CAEF) (Zenk 1964), deux composés sont également observables (fig. 14 (C)) : l' AIA (Rf 0.45) et un composé dont le Rf (0.05) correspond à celui trouvé par Zenk (1964) pour un β-indolylacétyl-D-glucopyranose.

Ces deux substances sont alors extraites de la plaque IV et rechromatographiées dans un solvant ammoniacal (AMIN). La fig. 15 résume les radiochromatogrammes obtenus.

Alors que l' AIA n'est absolument pas altéré par l' AMIN, l' AIA-glu est totalement transformé en IAAm. Aucun autre pic n'est décelé, ce qui indique que, d'une part, la transformation en IAAm est complète et que d'autre part, cette transformation est rapide, sinon un troisième pic d' AIA-glu non dégradé serait encore visible.

Les résultats concernant la souche MB étant qualitativement identique à ceux de la souche S, ils ne seront pas reportés ici.

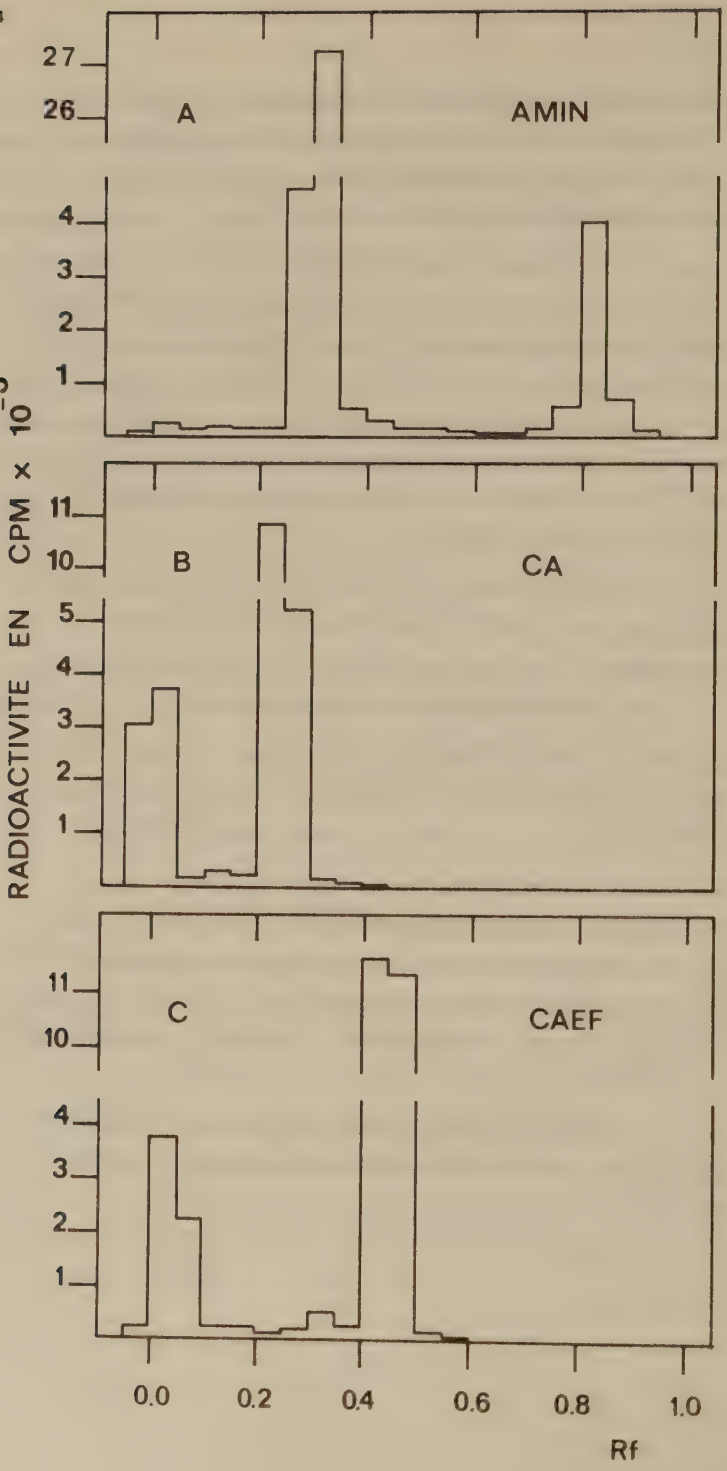

27
26
A
AMIN
4
3
2
1
RADIOACTIVITE EN CPM x 10^{-3}
11
10
B
CA
5
4
3
2
1
11
10
C
CAEF
4
3
2
1
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Rf

Figure 14 A, B et C : Radiochromatogrammes comparés d'un même extrait de composés indoliques après incubation .de cellules S avec de l'AIA*.

(A) : solvant : Acétate de méthyle - Isopropanol - Ammoniaque (45:35:20).

(B) : solvant : Chloroforme - Acide acétique (95:5).

(C) : solvant : Chloroforme - Acétate d'éthyle - Acide formique (50:40:10).

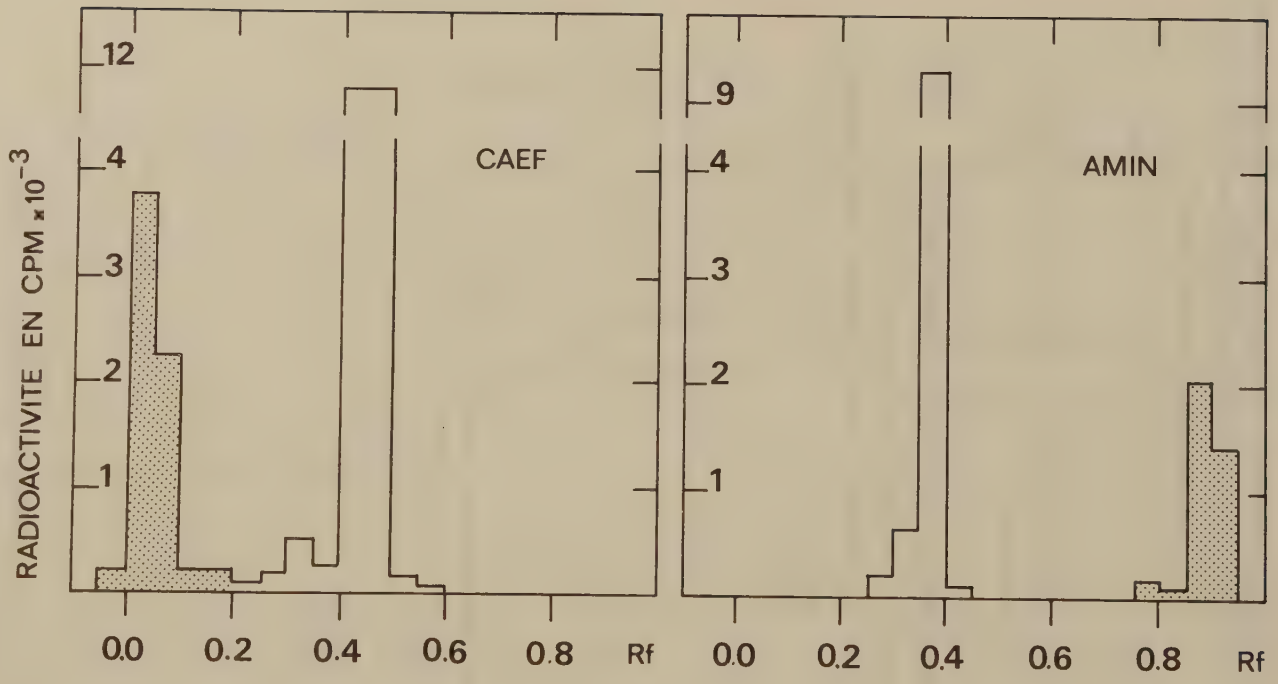


Figure 15 : Ammonolyse d'un AIA-glucoside en IAAm par chromatographie dans un solvant ammoniacal.

CAEF : zone en pointillé : AIA-glu ; zone claire : AIA. AMIN : zone en pointillé : AIA-glu rechromatographié dans le solvant AMIN ; zone claire : AIA rechromatographié dans le solvant AMIN.

4.4.1.3. Observations.

Les résultats présentés ci-dessus permettent de faire un certain nombre de remarques.

Tout d'abord la présence de produits de conjugaison de l' AIA à un composé de nature glucidique a pu être établie. En effet, la rupture de la liaison ester par l'ammoniaque est caractéristique de cette classe de composés (Piskornik et Bandurski 1972).

La transformation de l' AIA-glu en IAAm étant complète et rapide, on peut affirmer que cette réaction est quantitative. Par conséquent, les concentrations en IAAm sont directement proportionnelles à des concentrations en AIA-glu. Nous avons vu, sous 4.3.3. que la souche S formait en moyenne trois fois plus d' IAAm que la souche MB. Nous pouvons donc en conclure que la concentration en AIA-glu est plus élevée chez S que chez MB.

L'AIA non conjugué est tout-à-fait stable en milieu ammoniacal et peut être récupéré quantitativement après migration dans l' AMIN.

Aussi bien dans la souche S que dans la souche MB, on observe la formation d' AIA-glu. La nature chimique du sucre reste encore à préciser, bien que le Rf de notre AIA-glu corresponde à celui de l' AIA-glucose. En effet, la liaison à d' autres sucres a été mise en évidence à plusieurs reprises. Dans le Maïs, la liaison de l' AIA à un glucane cellulosique de haut poids moléculaire a été étudiée (Piskornik et Bandurski 1972). La conjugaison au myo-inositol a été également démontrée (Ehmann et Bandurski 1974, Kopcewicz et al. 1974), ainsi qu' à des macromolécules (Basu et Tuli 1972, Davies et Galston 1971). Ces derniers types de conjugués n' apparaissant que très

rarement dans la littérature. Des processus de conjugaison de l' AIA à des acides aminés, en particulier l'acide aspartique, ont par contre été très largement étudiés. Cette classe de composés sera étudiée et discutée au chapitre suivant.

4.4.2. Cinétique de formation des produits conjugués.

4.4.2.1. Avant-propos.

L' existence de produits conjugués de l' AIA ayant pu être établie dans les suspensions cellulaires d' Acer, nous avons étudié l' évolution de ces produits au cours de l' incubation et, notamment, la vitesse à laquelle les conjugués s'accumulent dans les cellules des deux souches.

Deux études cinétiques parallèles ont été réalisées :

(1) Une quantité fixe d' AIA-1-^{14}C est introduite dans le milieu au début de l' expérience et y est laissée pendant toute la durée de l' incubation. A la fin de cette période, les cellules sont récupérées et lavées, puis congelées dans l' azote liquide. Le matériel ainsi traité est conservé à - 80^{o} C jusqu'au moment de l' extraction.

(2) Au début de l' expérience, une quantité donnée d' AIA-1-^{14}C est mise en contact avec les cellules. Après 30 min., les cellules sont lavées et remises en suspension dans du milieu neuf, dépourvu d' AIA. Après 4 h. dans ces conditions, de l' AIA non marqué à la même concentration est introduit et laissé jusqu'à la fin de l' incubation.

Des prélèvements de 10 ml de suspension sont effectués à des temps variables et les cellules récupérées sont traitées comme dans la méthode (1).

Les conditions expérimentales (1) et (2) sont donc essentiellement différentes.

Les premières correspondent en fait aux conditions de culture dans lesquelles les cellules sont constamment en présence de l' hormone contenue dans le milieu. On observe donc par cette technique l'établissement d'un équilibre entre la pénétration continue de l' hormone et la métabolisation de celle-ci. En première analyse, il paraît donc difficile de suivre, dans ces conditions, l' évolution des conjugués une fois qu'ils sont formés. Cependant, insistons encore sur le fait que cette méthode reproduit les conditions dans lesquelles évolue la culture.

Les secondes, par contre, placent les cellules dans des conditions plus strictes, permettant une analyse rigoureuse de l' évolution des conjugués. Cependant, les conditions de cette méthode ne sont pas reproduites lors de la culture des cellules.

Au cours des premières 30 min., une quantité déterminée d' AIA-1-^{14}C pénètre dans les cellules. Cette quantité est limitée par la durée de contact avec l' AIA*.

Dans la deuxième étape, l' évolution du "pool" d' AIA* ainsi pénétré peut être étudiée et la fraction de ce pool transformée en conjugués est analysée.

La troisième étape, dans laquelle les cellules sont à nouveau en contact avec de l' AIA, qui est cette fois non radioactif, devrait permettre, en principe, d' étudier si les conjugués formés lors de la deuxième étape sont remétabolisés, ou si, au contraire, ce sont des produits terminaux restant stockés dans un compartiment cellulaire.

Cette dernière étape permettrait donc de savoir si, comme certains auteurs l' ont affirmé, les conjugués sont des produits de détoxification de l' AIA (Zenk 1964, Andreae 1967), ou si, par contre, ils peuvent constituer une forme de réserve de l' AIA.

4.4.2.2. Résultats selon la méthode (1).

La formation de produits de conjugaison de l' AIA après incubation de cell. S avec de l' AIA-1-^{14}C présent en continu dans le milieu est représentée sur la fig. 16 (A) En plus du conjugué à un glucoside, un autre type de conjugué apparaît, dès 1 h. d' incubation. Ce composé, dont la synthèse devient très importante au cours des 3 premières heures d'incubation, a pu être identifié au β-indolyacétyl-aspartate (IAAsp). En effet, son Rf dans le solvant CAEF (0.15 - 0.25) correspond à celui de l' IAAsp standard (0.17 - 0.23). Cette coïncidence des Rf a pu être observée lors de toutes les chromatographies effectuées dans ce chapitre.

La quantité d' AIA libre contenue dans la cellule diminue très rapidement et s'annule après 3 h. d' incubation. Les cellules étant constamment en présence d' AIA-1-^{14}C, il faut donc admettre qu'une certaine quantité d' AIA pénètre durant les 15 premières minutes et qu'ensuite, ou bien la cellule devient imperméable à l' AIA et il n'y a plus d'absorption, ou bien l' AIA du milieu est complètement dégradé après 15 min.

L'accumulation du glucoside d' AIA est très rapide dès le début de l' incubation, puis atteint un palier après 2 heures. Ensuite, il semble que ce composé soit légèrement hydrolysé, car sa concentration diminue lentement au cours des deux dernières heures.

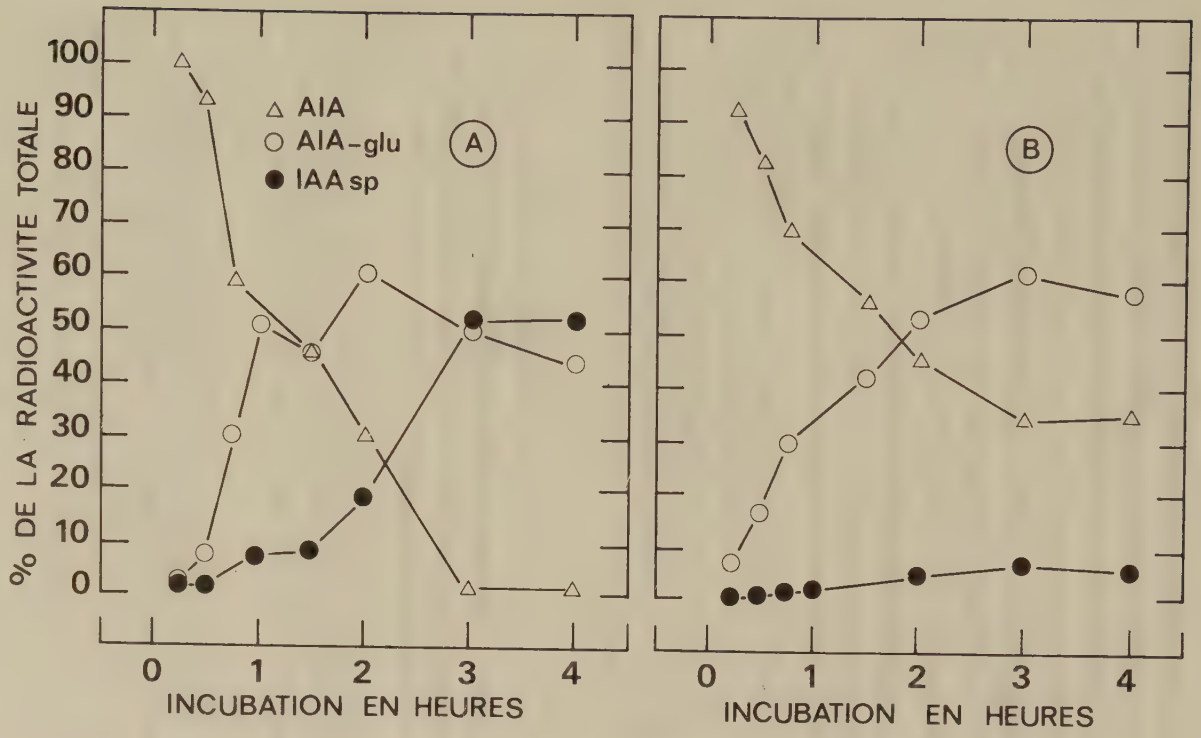


Figure 16 A et B : Cinétique de formation des produits conjugués de l'AIA étudiée par la méthode (1).

(A) : souche S ; (B) : souche MB. Conc. en AIA : 10^{-5}M; radioactivité spécifique : 2 mCi/mmole radioactivité introduite : 0.2 µCi/10 ml de suspension ; température : 27°C.

La quantité totale de conjugués (IAAsp + AIA-glu) suit une courbe complémentaire à celle de la diminution d' AIA libre. Après 3 h. d'incubation, la totalité de l' AIA pénétré a été transformée en conjugués. Bien que la teneur en AIA-glu diminue en fin d' incubation, la concentration en conjugués totaux se maintient à 100 % car l'accumulation d' IAAsp se poursuit au-delà de 3 h. bien que très faiblement.

Le comportement de la souche MB, placée dans des conditions identiques, est reporté sur la fig. 16 (B). Un certain nombre de différences apparaissent d'emblée par rapport à la souche S.

Tout d'abord, la synthèse d' IAAsp est extrêmement réduite. La concentration de ce composé ne dépasse pas 6 % de la radioactivité totale, alors qu'elle atteint 53 % dans la souche S. L' AIA libre diminue plus lentement que dans S et ne s'annule pas. Sa concentration se stabilise après 3 h. aux environs de 36 %.

La quantité totale de conjugués, identique à la quantité d' AIA-glu puisque la synthèse d' IAAsp est négligeable, suit une courbe semblable à celle observée pour S, mais se stabilise à 63 % après 3 heures d'incubation.

La synthèse du glucoside apparaît comme un phénomène primaire, en réaction à la pénétration de l' AIA. Elle s'effectue dès le début de l' incubation, sans période de latence dans les deux souches.

Par contre, la synthèse d' IAAsp dans la souche S intervient plus tardivement et n'atteint une vitesse maximale qu'après 90 min.

Il ne semble pas que l' AIA-glu puisse être considéré comme un précurseur de l' IAAsp. En effet, la diminution de taux en AIA-glu en fin d'incubation n'est pas proportionnelle à l'augmentation d' IAAsp.

Des résultats très voisins de ceux-ci ont été obtenus par Zenk (1964) sur Hypericum hircinum. Les mêmes phénomènes que pour S sont observés, mais ceux-ci se déroulent plus lentement, le plateau de synthèse d' IAA-glu n'apparaissant qu'après 12 h. d'incubation. La pénétration de l' AIA s'effectue également plus lentement ; alors que dans notre cas, la pénétration est terminée après 15 min., elle se poursuit durant 4 h. chez Hypericum. Après 4 h., la vitesse de la conjugaison de l' AIA est supérieure à celle de sa pénétration, et une diminution du taux en AIA libre est alors observée, sans qu'on puisse noter une activité auxines-oxydasique dans ce matériel.

4.4.2.3. Résultats selon la méthode (2)

Dans cette expérience, la teneur en AIA du milieu d' incubation est de 5×10^{-6} M, aussi bien pour l' AIA* que pour l' AIA non marqué injecté après 4 h. L' élimination de l' AIA-1-^{14}C après 30 min. est faite par filtration et lavage par du milieu neuf sans auxine. L' évolution des deux conjugués AIA-glu et IAAsp est reportée sur les fig. 17 (souche S) et 18 (souche MB).

La synthèse d' IAAsp n'a lieu, dans ces conditions également, que pour la souche S. Dans la souche MB, ce conjugué ne s'accumule que très lentement. Par contre l' AIA-glu semble être moins stable dans la souche S que dans la souche MB. Il commence à s' hydrolyser dans S aux environs de 6 h. et

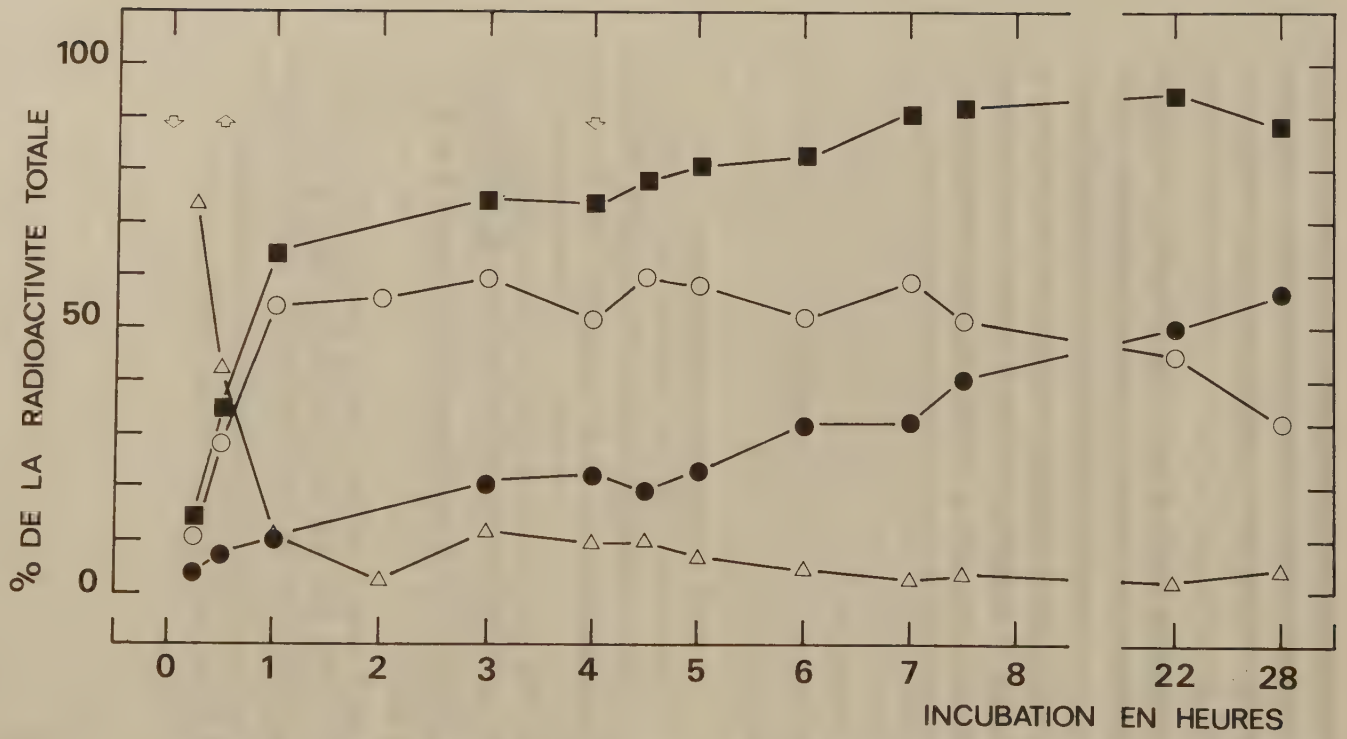


Figure 17 : Cinétique de formation des produits conjugués de l'AIA étudiée par la méthode (2) dans la souche S.

AIA : △ , IAAsp : ● , AIA-glu : ○ , AIA-glu + IAAsp : ■

Les flèches indiquent l'adjonction ou l'élimination d'AIA. Conditions : voir fig: 19.

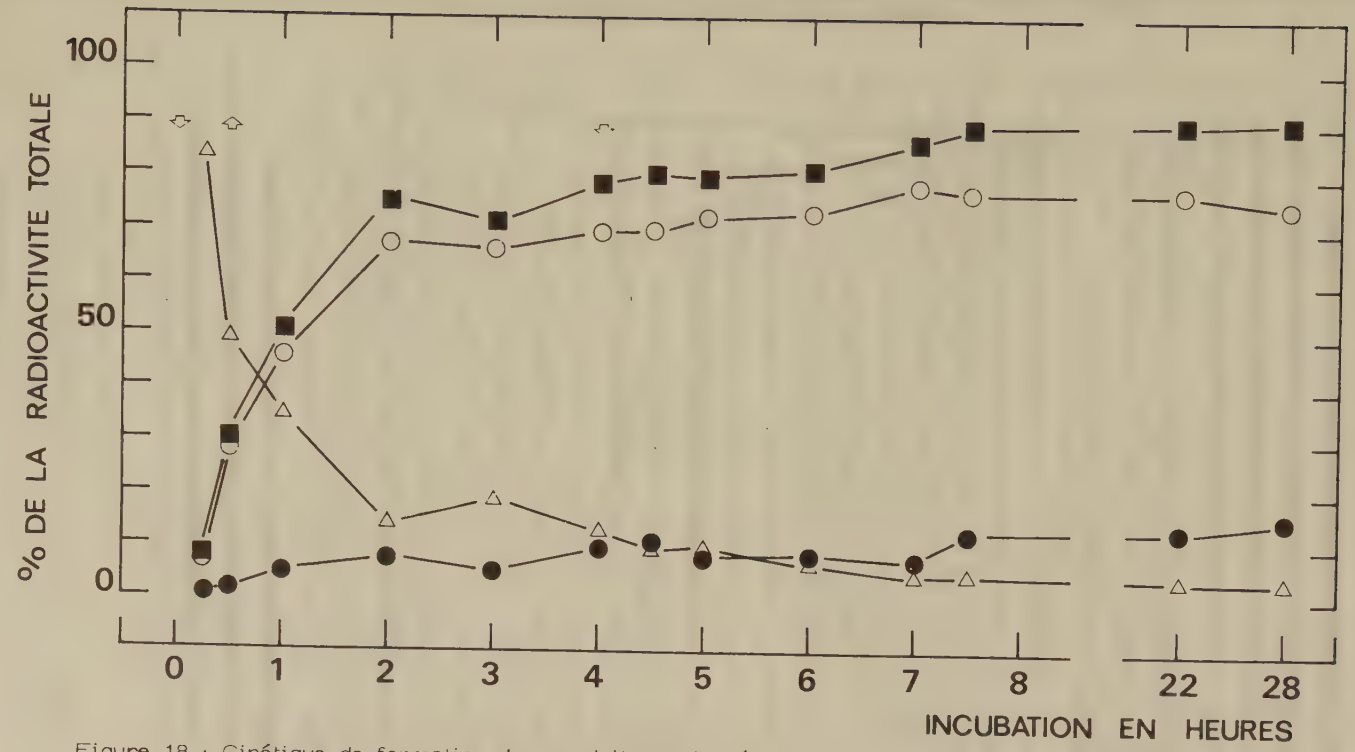


Figure 18 : Cinétique de formation des produits conjugués de l'AIA étudiée par la méthode (2) dans la souche MB.

AIA : △ , IAAsp : ● , AIA-glu : ○ , AIA-glu + IAAsp : ■

Les flèches indiquent l'adjonction ou l'élimination d'AIA. Conditions : voir fig : 19.

après 28 h., il n' en reste que 32 %, quantité qui s'était accumulée durant les 30 premières minutes de l'incubation. Dans MB, l' AIA-glu semble être stable à l' hydrolyse et se maintient au voisinage de 75 % dès la 7ème heure d' incubation.

Deux variables présentent une différence de comportement par rapport à la méthode (1) ; il s'agit de la quantité d' AIA libre dans la cellule et de la teneur en conjugués totaux.

Alors que par la méthode (1), nous observions que la souche MB conservait une certaine quantité d' AIA libre et que cette valeur s'annulait dans la souche S, le taux en AIA libre tend à s'annuler pour les deux souches dans le cas où la méthode (2) est utilisée. Nous ne pouvons tenter d'expliquer ce phénomène qu'en nous basant sur une hypothèse : à savoir que l' AIA pénétré est capable de ressortir dans le milieu d'incubation. Ce qui semble bien être le cas si l'on examine la fig. 19 dans laquelle la radioactivité totale à l' intérieur de la cellule, exprimée en nmoles d' AIA, a été reportée. En effet, lorsque l' AIA-1-^{14}C est retiré, la radioactivité intracellulaire diminue. L' injection d' AIA non marqué à 4 h. entraîne une nouvelle augmentation de la radioactivité dans les cellules. Il ne peut s'agir que d'une réabsorption à partir du milieu, aucun lavage n' ayant été effectué à ce stade ; cependant, cette réabsorption n'est pas seule en cause. En effet, si, comme nous l'avons vu précédemment, la pénétration représente 6 - 10 % de la radioactivité totale, il n'est pas possible d' expliquer que la courbe remonte jusqu'à des valeurs égales à celles observées après 30 min. dans l' AIA*, car, dans ce cas, la pénétration serait de 100 %. Un autre phénomène doit donc se produire, au sujet duquel nous ne savons rien pour l' instant. Ainsi, la quantité d' AIA pénétré observée correspondrait donc en partie à un équilibre entre une entrée et une sortie.

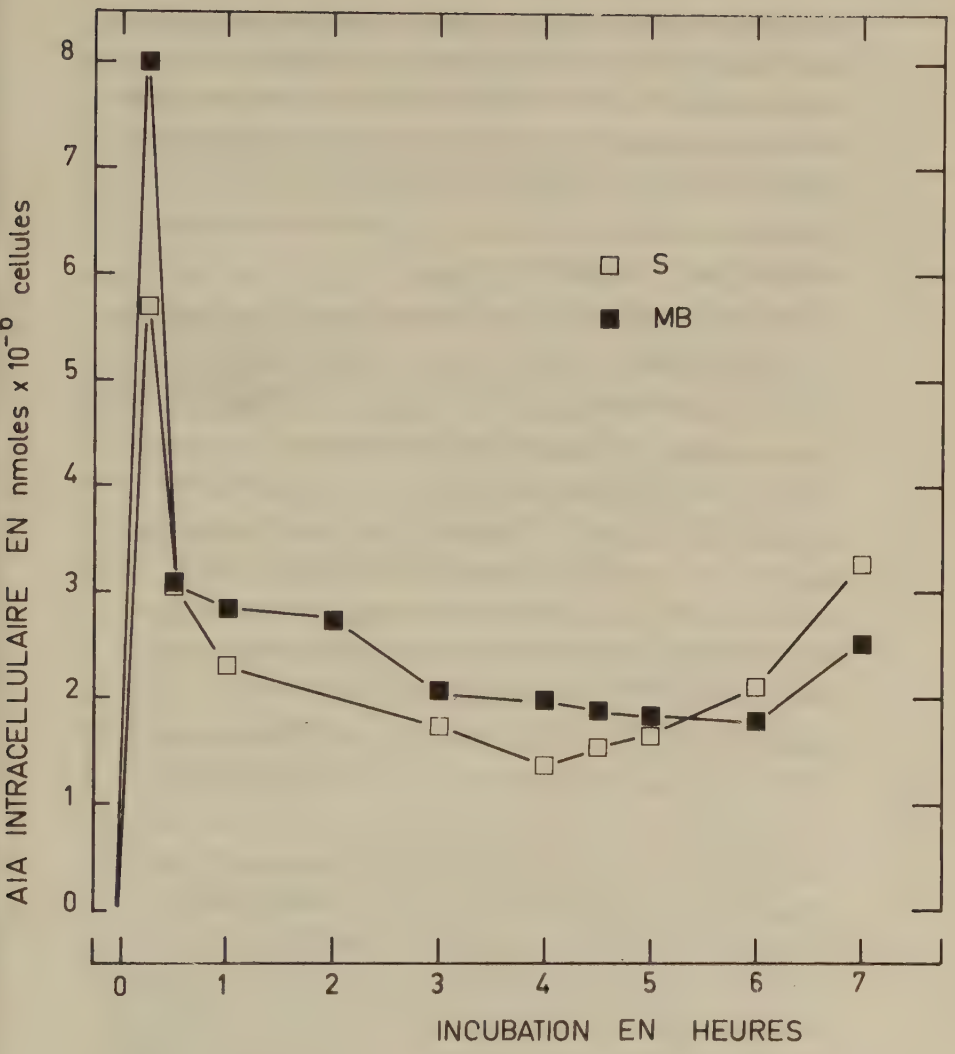


Figure 19 : Courbe cinétique de la concentration en AIA à l'intérieur des cellules d' Acer , selon la méthode (2).

Concentration en AIA : 5×10^{-6}M.

Radioactivité spécifique : 2 mCi/mmole ; radioactivité introduite : 0.2 µCi/10 ml suspension.

Température : 27°C.

Après un certain temps, cet équilibre se stabilise, pour autant que la cellule soit dans un milieu contenant de l' AIA. En plaçant la cellule après 30 min. dans un milieu sans AIA, cet équilibre est déplacé dans le sens de la sortie, entraînant ainsi une diminution de l' AIA libre dans la cellule.

D'autre part, notons encore, sur la figure 19, le phénomène initial qui suit l' injection d' AIA*.

Au début, une très grande quantité d' AIA pénètre dans la cellule et atteint un maximum entre 0 et 15 min. Puis la quantité d' AIA diminue très rapidement jusqu'à 30 min., et ensuite plus lentement.

Nous proposons d'expliquer ce phénomène par deux processus inverses intervenant parallèlement.

Au début, seul le premier processus (influx) interviendrait, puis, à partir du maximum situé entre 0 et 15 min., le deuxième processus (efflux) commencerait à agir. La résultante de ces deux processus conduirait alors à une courbe comportant un maximum, semblable à celle que nous avons observée.

Il semble probable, de plus, que l' influx soit un phénomène passif, alors que l' efflux résulterait plutôt d' un mécanisme actif.

Il faut cependant faire intervenir encore les phénomènes de conjugaison, puisqu'ils participent eux aussi à la diminution de l' AIA libre endogène. Andreae et Van Ysselstein (1956) ont montré que de l' AIA libre ne s'accumulait dans les cellules que lorsque la vitesse de pénétration excédait celle de la conjugaison et que la pénétration de l' AIA dépendait de sa concentration. Ces expériences indiquent donc que les systèmes de conjugaison peuvent être saturés. En présence d'une faible quantité d' AIA, ces systèmes le conjuguent entièrement.

Mais à partir d' une concentration-seuil, le système travaille à sa vitesse maximale, l' excédent d' AIA ne peut donc être conjugué et apparaît sous forme d' AIA libre dans la cellule.

Par conséquent, dans notre cas, nous pouvons considérer que les systèmes de conjugaison sont saturés, puisque de l' AIA libre apparaît dans les cellules.

Dans la première phase, en présence d' AIA-1-^{14}C, les cellules accumulent l' AIA et un équilibre entrée-sortie tend à s'établir.

Lorsque les cellules sont placées dans un milieu sans AIA, le pool d' AIA libre dans la cellule diminue pour deux raisons : les systèmes de conjugaison atteignent la vitesse maximale, et l' équilibre entrée-sortie est rompu, provoquant une sortie de l' AIA. Dans la méthode (1), seule la conjugaison intervient, entraînant une chute d' AIA libre moins rapide.

Notons encore, que malgré les phénomènes mentionnés ci-dessus, la chute d' AIA libre est toujours moins forte pour MB que pour S, aussi bien dans les conditions (1) que dans les conditions (2). Les cellules MB semblent par conséquent capables de livrer moins d' AIA que les cellules S.

Zenk (1964) a proposé une compartimentation de l' AIA dans des organelles cellulaires (vacuoles) pour expliquer la quantité d' AIA libre persistant dans les cellules après une incubation avec de l' AIA. Une régulation de ce type pourrait expliquer pourquoi, dans la méthode (1), nous observons une certaine quantité résiduelle d' AIA dans la souche MB après 3 h. d' incubation.

Enfin, nous pouvons affirmer à la suite de ces résultats que les conjugués, une fois formés, sont stables et ne subissent pas d' évolution particulière. En effet, si un turn-over de ces

produits avait lieu, l' adjonction d' AIA non marqué devrait entraîner une diminution de la radioactivité dans les conjugués. Or, nous n' observons rien de tel. La lente diminution de l' AIA-glu dans S ne semble pas être due à un turn-over, puisque cette diminution n' est pas accélérée par l' adjonction d' AIA non marqué.

La syntnèse d' IAAsp augmente régulièrement, jusqu'à ce que tout l' AIA libre soit conjugué. Ensuite, sa formation dépend de l' hydrolyse de l' AIA-glu. Nous pouvons donc nuancer la remarque faite au paragraphe précédent, selon laquelle l' AIA-glu n' est pas un précurseur de l' IAAsp. Le système responsable de la formation de l' AIA-glu cesse de fonctionner après un certain temps, et l' AIA-glu accumulé subit une lente dégradation, qui résulte probablement d'un phénomène chimique. L' AIA libéré par cette hydrolyse est repris par le système formant l' IAAsp qui, lui, ne cesse pas de fonctionner. La synthèse d' IAAsp à partir de ce moment dépend donc de l' AIA-glu, sans que celui-ci puisse être considéré comme un précurseur au sens strict du terme, puisqu' il peut s'accumuler à des taux considérables.

4.4.2.4. Observations.

La présence d' IAAsp dans les organismes végétaux a été mise en évidence pour la première fois par Andreae et Good (1955) dans des plantules de Pois incubées avec 2×10^{-4} M d' AIA.

Par la suite, les dérivés d' AIA formés par 12 espèces végétales après incubation avec de l' AIA ont été étudiés par Good et al (1956). Les produits les plus fréquemment retrouvés étaient l' IAAsp et l' IAAm. La synthèse d' IAAsp est apparue alors

comme un phénomène général. Notons, en passant, que ces auteurs, qui utilisaient des solvants chromatographiques ammoniacaux, ont trouvé de l' IAAm, produit de dégradation de l' AIA-glucose par l'ammoniaque. Ils avaient donc à leur insu mis en évidence le deuxième groupe important de conjugués : les AIA-glucosides (AIA-glu).

Andreae et Good (1957), poursuivant leur étude de la conjugaison à l' acide aspartique, démontrèrent que ce phénomène était général au métabolisme des acides carboxyliques. Incubées avec les acides indolylformique, indolylpropionique, indolylbutyrique, benzoïque et 2,4-dichlorophénoxyacétique, des plantules de Pois formèrent toutes les amides correspondantes sauf la 2,4-dichlorophénoxyacétamide et tous les conjugués à l' aspartate sauf l' acide indolylformylaspartique. L' acide 2,4-dichlorophénoxyacétyl-aspartique n' était présent qu'en traces, et 95 % de 2,4-D pénétré restait sous forme libre.

La pénétration et la conjugaison de l' AIA à l' acide aspartique semble d'ailleurs dépendre de la présence de Ca^{++} dans le milieu d' incubation (Andreae et Van Ysselstein 1960).

L' IAAsp a également été retrouvé comme composé endogène naturel (Klämbt 1960, Olney 1968, Weaver et Jackson 1963).

Zenk (1964) a étudié la répartition des systèmes responsables de la formation de l' AIA-glucose et de l' IAAsp dans 170 espèces végétales. La synthèse de l' AIA-glucose apparaît aussi bien chez les Bactéries, les Champignons et les Bryophites que chez les plantes supérieures. L' IAAsp, par contre, n' est formé que chez les plantes supérieures. Par conséquent, la conjugaison au glucose semble être un phénomène primitif du point de vue évolutif.

Nos propres résultats démontrent que seule la souche S forme de l' IAAsp. Il n' est pas exclu que la souche MB ait donc perdu cette capacité de synthèse, en réponse au traitement mutagène.

Cependant, le système responsable de la synthèse de l' IAAsp semble pouvoir être induit par divers acides carboxyliques (Südi 1964), en particulier ceux ayant une activité auxinique (Südi 1966 , Venis 1972). La souche S étant cultivée sur 2,4-D, il est donc possible que ce système soit déjà induit, alors que la souche MB, qui croît dans un milieu dépourvu d' auxines , n' a pas encore subi d' induction. L' absence de synthèse d' IAAsp chez MB pourrait donc être due seulement à l' absence d' agent inducteur.

Néanmoins, en nous rapportant à la fig. 18 (méthode (2)), nous pouvons voir que, même après un temps de contact assez long avec l' AIA, aucune synthèse significative d' IAAsp n' apparaît chez MB. Après 24 h. de contact avec de l' AIA, il semble que l' induction aurait dû avoir lieu, bien que nous ne possédions pas d' informations précises sur la durée réelle de cette phase dans l' Acer. Rekoslavskaya et al. (1974) font état d' une durée de 6 h. pour des cultures autonomes de Tabac, de Ronce et de Scorsonères. Le temps nécessaire à l' induction peut cependant être réduit par un pré-traitement à l' AIA. Dans les expériences où un pré-traitement est effectué pour induire la formation de conjugués à l' aspartate, la durée de celui-ci est de 10 à 12 heures (Venis 1972, Südi 1966).

Il semble donc bien que le système responsable de la formation de l' IAAsp soit absent chez MB et ne puisse pas être induit par un traitement à l' AIA, dans les limites de la durée de notre incubation (28 h.).

Cette absence de synthèse d' IAAsp chez MB pourrait, à notre avis, fournir une explication de son indépendance aux auxines. En effet, il semble bien que l' activité des conjugués sur l' élongation de fragments d' organes végétaux est nulle ou très faible (Andreae 1966), bien que peu de données soient connues à ce sujet. De plus, l' AIA endogène est également soumis à la conjugaison à l' aspartate, comme nous l' avons vu précédemment. D' autre part, la synthèse d' AIA à partir de tryptophane ne diffère pas dans les deux souches. Par conséquent, le taux en AIA endogène est maintenu à des valeurs très faibles dans S, du fait de sa conjugaison, alors que dans MB, la concentration en AIA libre resterait plus élevée, permettant ainsi la croissance des cellules. Cependant, aucune différence dans le taux d' AIA endogène n' a pu être révélée (voir 4.2.)

Néanmoins, Thurmann et Street (1962) mettent en évidence une activité de l' IAAsp sur la croissance, grâce à des biochromatographies, La possibilité d' une hydrolyse du conjugué lors de l' incubation n' est pas exclue. Muir (1970), analysant la conjugaison à l' acide aspartique dans des plantules de Pisum naines ou normales, constate que l' IAAsp est sans effet sur le test de courbure d' Avena, mais permet une légère croissance des coléoptiles à la concentration la plus élevée (4×10^{-4} M). Cette activité pourrait être expliquée par une hydrolyse de l' IAAsp durant les 24 h. du test. De plus, les plantules naines forment toujours plus d' IAAsp que les normales, lorsqu'elles sont exposées à la lumière. L' auteur met donc en relation le nanisme avec une teneur faible en auxine diffusible.

Concernant l'activité de l' AIA-glucose dans les tests biologiques, les indications sont imprécises. D' une part, Zenk (1964)

affirme que ce sont des produits de détoxification, bien qu' ils possèdent une activité dans le test de courbure d' Avena. D'autre part, Keglevic et Pokorny (1969), ayant réalisé la synthèse chimique de l' AIA-glucose, trouvent que l' activité de ce complexe est supérieure à celle de l' AIA, lors d' un test d' allongement. Pour vérifier si leur composé synthétique ne possédait pas une activité explicable par sa synthèse chimique, ces auteurs extraient de coléoptiles d' Avena un composé ayant les mêmes propriétés chromatographiques que l' AIA-glucose synthétique. L' activité de ce composé est identique à celle de l' AIA-glucose obtenu par synthèse chimique.

A l' égard de ce travail, deux remarques nous semblent devoir être formulées :

-- tout d' abord, aucun renseignement sur la pénétration de l' AIA-glucose n' est donné.

-- de plus, nous avons déjà mentionné que les systèmes responsables de la dégradation de l' AIA semblaient être localisés à la périphérie de la cellule, cette affirmation devant être développée plus loin. Dès lors, il est très vraisemblable que les enzymes dégradent l' AIA-glucose moins rapidement que l' AIA, permettant ainsi à un nombre supérieur de molécules d' AIA de pénétrer intactes, celles-ci étant en quelque sorte protégées par la conjugaison. Une fois pénétré, l' AIA-glucose peut subir une hydrolyse, libérant ainsi de l' AIA libre.

Ces considérations pourraient expliquer la plus grande activité de l' AIA-glucose observée par les auteurs.

4.4.3. Identification du sucre présent dans le glucoside d' AIA.

4.4.3.1. Avant-propos.

Les résultats du paragraphe précédent démontrent l' existence d' une forme liée de l' AIA à un composé de nature glucidique. Nous nous sommes alors demandé quel était le type de sucre engagé dans ce complexe. En effet, le solvant CAEF utilisé lors des chromatographies, permet de distinguer entre les conjugués au glucose et d' autres types de conjugués non glucidiques, par exemple l' IAAsp et l' indolyl-acétyl-méthyl-ester (Zenk 1964) ; mais il ne sépare pas entre eux les différents conjugués à des sucres. Or, plusieurs conjugués de ce type ont été mis en évidence : l' AIA-glucose (Zenk 1961), l' AIA-myo-inositol et ses dérivés tels que l' AIA-myo-inositol-arabinoside ou -galactoside (Ueda et Bandurski 1969, Ueda et al. 1970), et enfin, plus récemment, l' AIA-rhamnose, isolé des parties florales du Peltophorum ferrugineum par Ganguly et al. (1974).

Le composé, que nous avons convenu d' appeler AIA-glu, pourrait par conséquent appartenir à l' un des types mentionnés ci-dessus, qui ne sont pas séparés entre eux par le solvant CAEF.

Nous avons tout d'abord cherché à savoir si notre AIA-glu était de l' AIA-glucose. Dans ce cas, la comparaison avec de l' AIA-glucose standard pourrait amener un certain nombre de preuves en faveur de cette hypothèse. Malheureusement, l' AIA-glucose n' est pas fourni par les firmes de produits chimiques et sa synthèse, selon la méthode de Keglevic et Pokorny (1969), n' était pas réalisable dans notre laboratoire. Quelques auteurs ont utilisé comme standard l' AIA-glucose formé par des plantules de Maïs, mais nous ne pensons pas qu'un tel composé

puisse jouer le rôle de standard dans notre cas, puisque sa nature chimique est au moins aussi imprécise que celle de notre AIA-glu.

L' hydrolyse de l' AIA-glu par une β -glucosidase aurait permis également de préciser sa nature chimique ; cependant, cette technique d' approche n'est pas non plus satisfaisante, les β -glucosidases commerciales étant très impures, et de plus assez peu spécifiques du glucose.

En outre, la quantité d' AIA-glu formé lors de nos expériences est très faible, de l' ordre du nanogramme. Cette quantité peut bien sûr être augmentée en partant d'un plus grand volume de suspension cellulaire. Cependant, il n' est pas possible d' augmenter indéfiniment ce volume, car le rendement d' extraction est d' autant plus faible que la quantité de matériel est grande, sans tenir compte des problèmes techniques posés par une extraction à grande échelle.

A ces faibles concentrations, l' emploi de réactifs spécifiques des sucres (par exemple l' o-dianisidine) ne donne lieu à aucune coloration.

Nous avons alors essayé d' analyser, par chromatographie en phase gazeuse, le sucre libéré lors d' une hydrolyse acide de l' AIA-glu.

4.4.3.2. Méthode.

100 ml de suspension cellulaire S et MB âgées de 10 jours sont filtrées, les cellules rincées par 100 ml de milieu neuf et remises en culture dans 200 ml de milieu frais.

Après équilibration de 30 min à 25° C, de l' AIA-1-^{14}C est injecté à la culture (concentration finale : $2,5 \times 10^{-5}$ M ; activité spécifique finale : 2 mCi / mmole), qui est alors incubée 4 h. à 25° C, à la lumière.

A la fin de cette période d' incubation, les cellules sont lavées, congelées et extraites comme précédemment (voir 3.2.) L' extrait (0.5 ml) est alors chromatographié sous forme d'une bande de 15 cm. de longueur dans le solvant CAEF.

La zone de Rf 0.05 - 0.20, correspondant à l' AIA-glu, est récupérée et réextraite trois fois par le mélange chloroforme-méthanol (1 : 1 v/v).

Parallèlement, un témoin (TE) est réalisé en traitant 100 ml de suspension cellulaire de manière identique, mais sans incubation avec l' AIA*.

Les extraits obtenus sont alors traités pour dériver les sucres en leurs alditols acétylés, selon la méthode décrite par Sloneker (1972). Les principales étapes sont décrites ci-dessous.

a) Hydrolyse.

Les trois extraits (S, MB et TE) sont évaporés à sec et hydrolysés par 4 % H_2SO_4 à 120° C durant 1 heure. Après refroidissement, l' acidité est neutralisée par du $BaCO_3$, puis 5 µg de xylose sont ajoutés comme standard interne. Après filtration sur filtre de verre type GF A, le volume de l' extrait est ajusté à 5 ml avec de l' eau bidistillée.

b) Préparation des alditols.

Environ 50 mg de $NaBH_4$ sont ajoutés à chaque extrait. La réaction est terminée en 12 - 18 h.

L' excédent de $NaBH_4$ est éliminé par de l' acide acétique. Après évaporation à sec, l' extrait est redissout dans 3 ml de méthanol et réévaporé. Cette opération est répétée 5 fois.

c) Acétylation.

Le résidu sec est traité par 5 ml d' anhydride acétique et chauffé à 120° C pendant 3 heures. Après évaporation à sec, l' extrait est lavé par 2 fois 5 ml d' H_2O, puis repris finalement par du CH_2Cl_2, filtré, évaporé et conservé à sec.

d) Chromatographie en phase gazeuse.

Avant l' analyse, l' extrait est redissout dans 0.2 ml d'acétone. 2 µl d' extrait sont injectés sur une colonne de GC en verre, contenant 3 % ECNSS - M sur GasChrom Q 100-120 mesh (Perkin-Elmer). Le gaz vecteur est de l' azote, dont le débit est maintenu à 50 cm^3/min.

La température initiale est de 150° C et s' élève dès l'injection de 1° par min., pour atteindre 190° C. Cette température finale est maintenue pendant 10 min.

Les sucres séparés sont détectés par ionisation de flamme (FID). La température du détecteur et de l' injecteur est réglée à 250° C. Le chromatographe (Perkin-Elmer, modell F 30) est muni d' un intégrateur électronique programmable, permettant une bonne estimation quantitative des pics.

4.4.3.3. Résultats.

La quantité d' AIA-glu formée lors de cette expérience a été calculée sur une aliquote de l' extrait, chromatographiée dans le solvant CAEF.

La radioactivité du spot d' AIA-glu a été estimée par scintillation liquide. A partir du nombre de dpm mesuré dans ce spot, il est facile, connaissant la radioactivité spécifique de l' AIA* dans le milieu d' incubation, (2 mCi/mmole), de calculer le nombre de µmoles d' AIA engagées dans une liaison ester avec le composé glucidique que nous désirons caractériser. Comme chaque molécule d' AIA est liée à une molécule de sucre, nous pouvons en déduire le nombre de µmoles de glucoside présent dans l' aliquote.

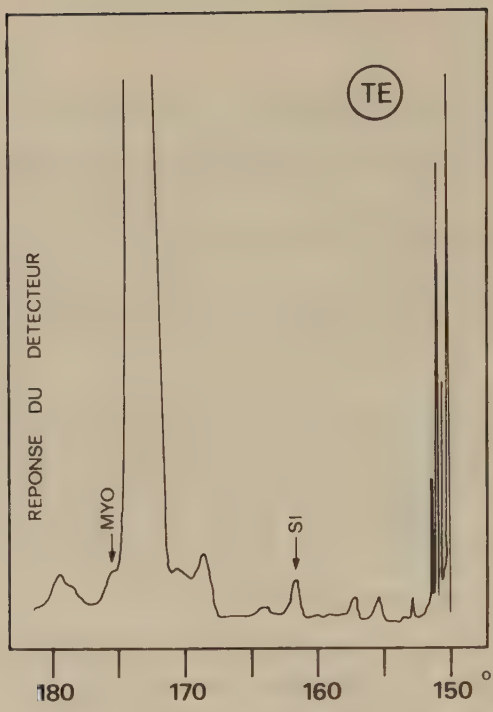
Nous avons ensuite transformé ces µmoles de glucoside en µgrammes, en supposant que le PM du sucre est de 180, ce qui serait le cas du glucose, par exemple.

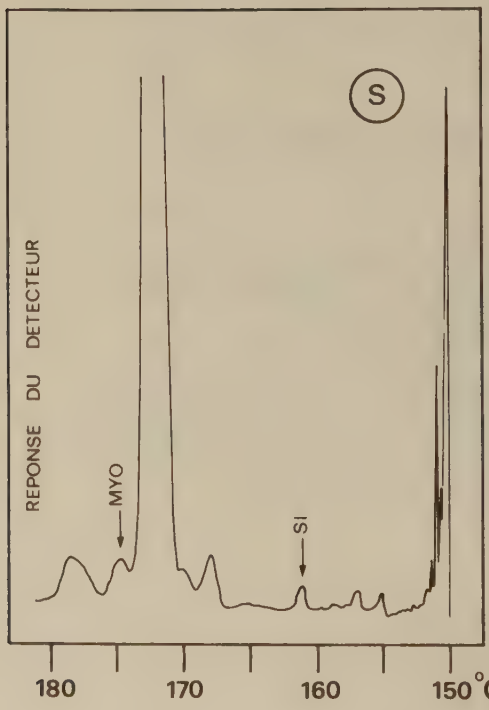
Par ce type de calcul, nous avons obtenu pour S : 7.17 µg de glucose formé et pour MB : 5,93 µg.

Les spots d' AIA-glu et d' IAAsp sont suffisamment éloignés pour qu' il n' y ait pas de contamination radioactive de l' un à l' autre.

Nous avons alors cherché, après chromatographie en phase gazeuse, un sucre dont la quantité soit du même ordre de grandeur que les valeurs ci-dessus, après soustraction du TE.

En examinant sur la fig. 20 les pics obtenus, on constate tout d' abord que l' extrait est en grande partie formé de glucose. Sa quantité dans S diminuée de celle du TE est de 29 µg environ et dans MB de 600 µg. Par conséquent, l'éventuel glucose


TE
REPONSE DU DETECTEUR
MYO
SI
180
170
160
150 °C


S
REPONSE DU DETECTEUR
MYO
SI
180
170
160
150 °C

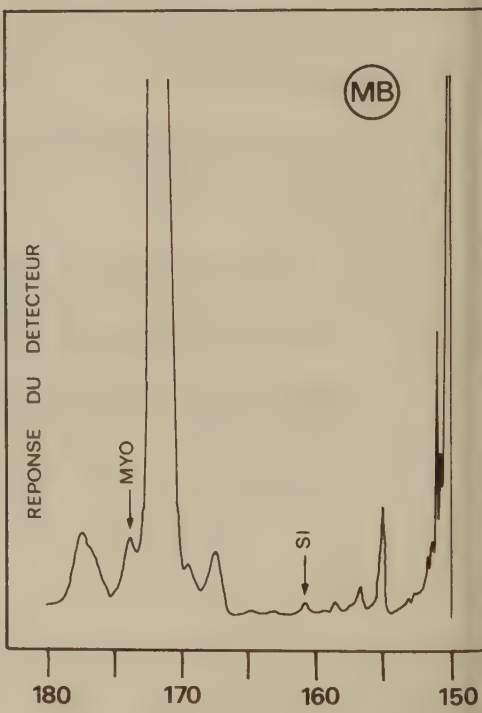

MB
REPONSE DU DETECTEUR
MYO
SI
180
170
160
150

Figure 20 : Chromatographie en phase gazeuse de la zone de Rf : 0.05 - 0.20 après migration d'extraits S , MB et TE dans le solvant CAEF.

S : extrait de composés indoliques totaux de 100 ml de cellules S incubées avec 2.5×10^{-6}M d'AIA-1-^{14}C.

MB : idem, pour un extrait de cellules MB.

Radioactivité spécifique finale de l'AIA-1-^{14}C : 2 mCi/mmole
Radioactivité introduite : 2 µCi/100 ml de suspension
Durée de l'incubation : 4 heures.
Température : 27°C

SI : standard interne (5 µg de xylose)
MYO : myo-inositol
Le plus grand des pics est le glucose.

provenant de l' AIA-glu est totalement masqué. Une telle contamination peut être très facilement expliquée, le glucose étant un composé répandu dans la cellule, qui, de plus, est cultivée sur saccharose, facilement hydrolysé par les invertases mises en évidence dans l' Acer (Copping et Street 1972).

Par contre, le pic de myo-inositol semble plus intéressant. En effet, ce composé est présent en très faible quantité dans le TE (0.885 µg) et en concentrations plus élevées dans S (14.228 µg) et dans MB (10.827 µg).

Les différences entre S et TE et MB et TE résulteraient de l' hydrolyse du conjugué AIA-myo-inositol.

L' erreur sur ces quantités est considérable, à cause de la haute sensibilité à laquelle l' appareil a dû être réglé pour pouvoir détecter les faibles concentrations présentes dans nos extraits. Cette erreur est admissible lorsque le pic observé correspond à une quantité voisine de celle du standard interne (5 µg), mais elle s' accroît si le composé étudié est en concentration nettement plus élevée que le standard ; ce qui est le cas du glucose, par exemple. Les chiffres que nous présentons ci-dessus n' ont par conséquent qu'une valeur indicative.

Le pic de galactose, précédant immédiatemant le glucose (temps de rétention : 18.2 min. ; température : 168.2° C) semble également plus élevé dans S et MB que dans le TE. (0.22 µg dans TE et 1.47 et 4.63 µg dans S et MB respectivement).

Les autres sucres ne montrent pas de différence avec le témoin.

4.4.3.4. Observations.

Bien qu' un certain nombre d' indications ait pu être obtenu grâce à cette expérience, la nature chimique du sucre lié à l' AIA n'a pas pu être déterminée avec précision.

Le spot radioactif de l' AIA-glu isolé de la chromatographie sur couche mince est en fait composé de plusieurs substances, la plupart de nature glucidique, qui interfèrent dans l' analyse. Il est donc difficile de reconnaître le sucre libéré par hydrolyse de l' AIA-glu, même par comparaison avec le TE.

Pour obtenir des résultats plus clairs, il aurait été souhaitable de pouvoir isoler l' AIA-glu sous une forme plus pure.

Il est possible que notre AIA-glu soit un composé de type AIA-myo-inositol, mais une caractérisation plus poussée est nécessaire avant de pouvoir l' affirmer.

Signalons encore pour terminer que la grande quantité de glucose observée dans S et MB pourrait s' expliquer en admettant l' existence d'un glucane. Nous ne sommes toutefois pas très favorables à cette hypothèse, car le degré de polymérisation de ce glucane serait alors très différent dans les deux souches : une molécule d' AIA liée à 5 unités de glucose dans S et à 100 dans MB environ. Il semble difficile d' expliquer une telle différence dans les poids moléculaires du polymère lié à l' AIA.

4.5. Localisation du complexe auxines-oxydasique.

4.5.1. Avant-propos.

Nous avons vu sous 4.3.3.4. que, bien que les cellules S et MB possèdent des systèmes auxines-oxydasiques actifs décarboxylant l' AIA, aucun produit de dégradation ne peut être retrouvé à l' intérieur des cellules. La totalité de ces composés reste dans le milieu d' incubation.

Comme le filtrat d' une suspension cellulaire (milieu conditionné) ne décarboxyle pas l' AIA*, nous sommes conduits à penser que les systèmes actifs responsables de la dégradation de l' AIA sont situés à la périphérie de la cellule.

Aucune corrélation vraie ne peut être définie entre l' activité AIA-oxydasique d' un extrait de cellules entières et la quantité d' AIA accumulée dans la cellule, car, bien que la pénétration soit très semblable dans S et MB, l' activité de dégradation de l' AIA est significativement différente. Par conséquent, nous pouvons dire que l' activité auxines-oxydasique d' un extrait n' est pas l' expression de l' activité endogène des enzymes, ou bien que ces enzymes n' agissent pas dans le cytoplasme en tant qu' auxines-oxydases.

La nature extracellulaire du système de dégradation de l' AIA a été postulée par de nombreux auteurs, qui le localisent dans la paroi ou le périplasme (Straus et Campbell 1963 ; Wichner 1967 ; Andreae et Van Ysselstein 1956 ; Andreae et al. 1961 ; Schiewer et al. 1967).

Pour confirmer notre hypothèse, nous avons étudié la décarboxylation de l' AIA par des protoplastes d' Acer. Si les

auxines-oxydases sont situées dans la paroi ou dans le périplasme, la décarboxylation de l' AIA par ce type de matériel devrait être nulle.

Il n' est cependant pas exclu que la présence du plasmalemme, susceptible de fixer spécifiquement les auxines (voir plus loin) complique l' hypothèse énoncée ci-dessus.

4.5.2. Résultats.

Des cellules entières, des cellules plasmolysées et des protoplastes ont été mis en présence d' AIA-1-^{14}C, pendant 1 h. pour les deux premiers et 2 h. pour le troisième matériel.

Les différentes activités de décarboxylation exprimées en cpm et en nmoles pour 10^6 cellules des 3 types de matériels sont reportées dans le tableau 10. Ainsi que nous l' avions déjà observé au paragraphe 4.3.2.2., les cellules MB ont une activité de décarboxylation plus forte que les cellules S.

Cette différence se retrouve avec les cellules plasmolysées.

Contrairement à ce que nous attendions à la suite de notre hypothèse, la décarboxylation est plus forte dans les cellules plasmolysées et les protoplastes que dans les cellules intactes. Ce phénomène est beaucoup plus net avec la souche MB qu' avec la souche S.

Ceci se comprend néanmoins si l' on considère que la souche S a fourni des protoplastes avec un rendement très faible, alors que pour MB, ce rendement était nettement plus élevé. Malheureusement, le nombre exact de protoplastes n'a pas pu être estimé. Néanmoins, le nombre de protoplastes ne peut être qu' inférieur au nombre de cellules plasmolysées ; il s' ensuit que les valeurs de décarboxylation ramenées à 10^6 cellules / ml sont en tout cas supérieures à celles que nous avons rapportées, ce qui contribue encore à accroître la différence avec les cellules intactes.

Tableau 10 : Décarboxylation de l' AIA-1-^{14}C par des protoplastes, des cellules plasmolysées et des cellules intactes d' Acer.

Matériel	nb cell / ml	cpm CO_2* / h	nmoles CO_2 / 10^6 cell.
cell. S	900'100	1'495	0.38
cell. MB	889'700	7'402	1.89
plasm. S	822'000	1'685	0.47
plasm. MB	1'026'000	18'397	4.08
protos S	-	2'617	-
protos MB	-	22'677	-
TE CO_2	-	289	-

cell. : cellules entières

plasm. : cellules plasmolysées

protos : protoplastes

TE CO_2 : décarboxylation par le milieu d' incubation dépourvu de matériel biologique.

Concentration en AIA : 10^{-5} M.

Radioactivité spécifique finale de l' AIA-1-^{14}C : 2 mCi / mmole.

En résumé, l' élimination du contact entre la paroi et l' intérieur de la cellule (plasmolyse) se traduit par une augmentation d' activité de 116 % pour MB et de 24 % pour S. La suppression de la paroi et du périplasme (protoplastes) provoque une élévation de l' activité de 206 % au minimum chez MB et de 75 % au minimum chez S.

4.5.3. Observations.

Il est donc évident que les systèmes auxines-oxydasiques ne sont pas localisés dans la paroi ou le périplasme, puisque l' activité enzymatique est maintenue en l' absence de ceux-ci.

Par contre, il se pourrait bien que le site de décarboxylation de l' AIA soit localisé dans le plasmalemme. En effet, dans le cas des protoplastes, ces sites étant directement en contact avec l' AIA du milieu, la décarboxylation est donc plus forte que lorsque la paroi est présente et agit comme un écran à la pénétration de l' AIA. Cependant, l' obstacle à la pénétration représenté par la paroi ne permet pas d' expliquer à lui seul cette forte augmentation de l' activité, puisque les cellules plasmolysées ont également une activité plus élevée.

L' existence d' auxines-oxydases liées au plasmalemme a été démontrée par Van der Mast (1970 a,b). D'autre part, des sites de fixation de l' AIA sur les membranes plasmiques en général et sur le plasmalemme en particulier ont été révélés par les travaux de Hertel et al. (1972) et Pilet et Cuendet (en préparation). Il n' est pas exclu que ces sites de fixation coïncident avec les sites de décarboxylation. Nous avons tenté d' établir une

relation entre la fixation et la décarboxylation de l' AIA par des fractions membranaires enrichies en plasmalemme (Hertel 1974 ; Hertel et al. 1972) . Bien que ces fractions aient fixé une faible quantité de l' AIA fourni, aucune décarboxylation n' a pu être mise en évidence.

La difficulté d' obtenir des fractions de plasmalemme relativement pures, et en quantité suffisante pour le dosage de la décarboxylation par la méthode du CO_2 radioactif dégagé nous ont contraint à abandonner cette étude.

4.6. Discussion de quelques résultats.

Alors que dans les extraits tissulaires, une activité auxines-oxydasiques peut être mise en évidence, pour autant que ceux-ci soient débarrassés de leurs inhibiteurs naturels par une purification sur gel de Sephadex, aucún produit de dégradation de l' AIA ne peut être retrouvé dans le cytoplasme, lorsqu' une incubation avec de l' AIA* est réalisée.

Nous avons donc souligné la probable nature extracellulaire des AIA-ox. Ces enzymes ne sont pas situées dans la paroi ou dans le périplasme , puisqu' une décarboxylation très active a lieu chez des protoplastes préparés à partir d' une culture en suspension.

Il est donc probable que ces enzymes soient localisées dans le plasmalemme, bien que l' activité décarboxylative des protoplastes en soit une condition nécessaire, mais pas suffisante. Cependant, cette affirmation peut être étayée par quelques faits :

(1) Absence de produits décarboxylés dans le cytoplasme

(2) La conjugaison à l' acideaspartiqueou à un sucre du type myoinositol est la seule voie métabolique de l' AIA intracellulaire.

(3) Les produits de dégradation de l' AIA ne sont présents que dans le milieu d' incubation.

Nous proposons donc, pour résumer, le schéma de la figure 21.

Il est curieux de constater que, si la dégradation de l' AIA à lieu sur plasmalemme, aucun des produits de cette dégradation ne peut entrer dans la cellule, bien que l' AIA lui, en soit capable. Il doit donc exister un mécanisme, ou une propriété, du plasmalemme qui "repousse" ces composés d'une manière active.

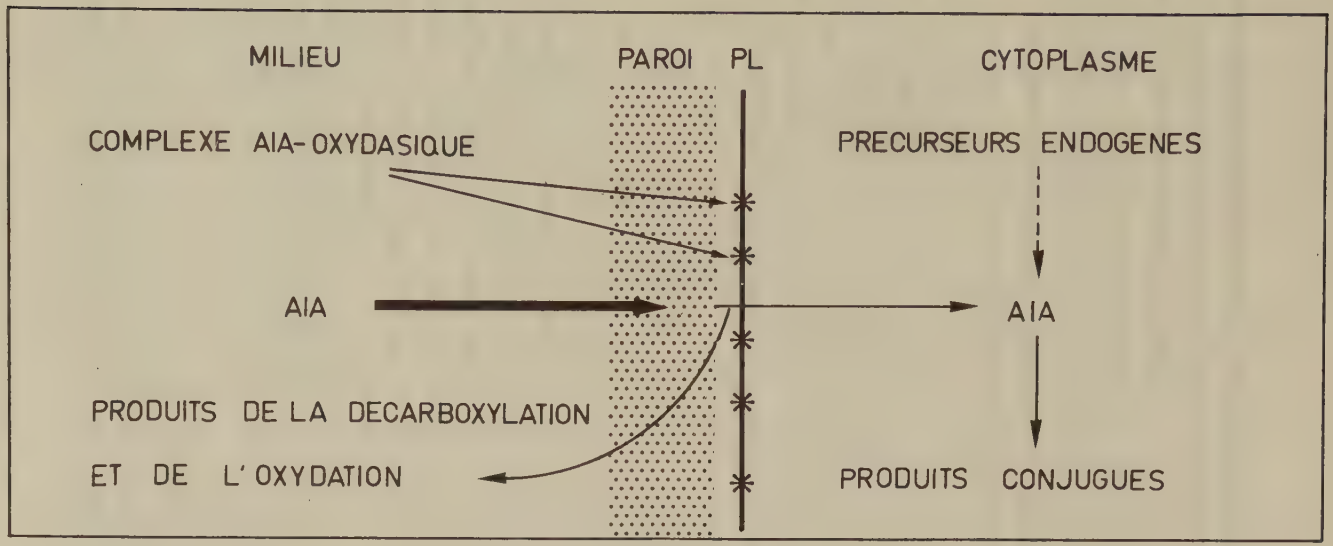


Figure 21 : Schéma du devenir de l'AIA exogène fourni à des cellules d'Acer.

En effet, la cellule baignant dans un milieu qui contient ces produits de dégradation, devrait, par le phénomène physique de la diffusion passive, en absorber au moins une partie. Or, ce n'est pas le cas. Nous avons donc affaire dans ce cas à un mécanisme semblable à l' élimination active des déchets.

Nous ne possédons malheureusement aucun renseignement sur un tel mécanisme fonctionnant pour les produits du métabolisme de l' AIA.

Ce phénomène, combiné à la conjugaison de l' AIA pénétré, contribuerait donc à maintenir un taux non toxique d' AIA à l' intérieur de la cellule. Nous avons vu que la quantité d' AIA endogène était extrêmement faible dans ce type de matériel, environ 10'000 fois inférieure à la concentration fournie lors des incubations.

Relevons encore ici un avantage des cultures en suspension cellulaire que nous avons déjà mentionné lors de l' Introduction. De tels résultats ne pouvaient être révélés par l'emploi de fragments d' organes ou de cultures sur gélose, le lavage des espaces intercellulaires étant impossible dans ces matériels. La dissociation en cellules isolées permet, par la suppression de ces compartiments intercellulaires, de distinguer de manière sûre entre un produit extra ou intracellulaire.

Les autres tissus indépendants (tissus tumoraux ou anergiés) sont généralement caractérisés par une teneur élevée en auxine endogène, ce qui suppose que cette hormone est un facteur de leur multiplication.

Dans le cas des cellules d' Acer, il n'est pas exclu alors que l' AIA ne puisse pas être considéré comme un tel facteur puisque la concentration en AIA endogène n'est pas significat i-

vement différente dans les deux souches. Le variant MB serait donc caractérisé par une indépendance réelle, c'est-à-dire que l' AIA n'est pas nécessaire à sa croissance.

De plus, l' activité auxines-oxydasique de MB est plus forte que chez S. Nous pouvons donc en inférer que, dans ce matériel du moins, il n'y a pas de corrélation entre l' exigence en auxines et l' activité des auxines-oxydases. Lipetz et Galston (1959) sont arrivés aux mêmes conclusions en comparant l' activité auxines oxydasique de tissus normaux et de crown-gall de Parthenocissus. Ils postulent cependant que les différences observées seraient dues à une instabilité de la fraction des peroxydases ayant une activité AIA-ox. L' enzyme des tissus normaux serait plus instable qu cours du broyage que celle des tissus de crown-gall. Dans le cas des cellules d' Acer, rappelons que c' était une fraction du complexe AIA-ox de la souche indépendante MB qui était instable lors de la lyophilisation.

Cependant, bien qu'il n' existe peut-être pas de relation entre les auxines-oxydases et l' indépendance, des différences aussi bien quantitatives que qualitatives ont été révélées à propos des AIA-ox des deux souches : la dégradation de l' AIA est plus faible dans la souche sauvage, mais le complexe enzymatique responsable de cette dégradation est stable à la lyophilisation. Pour la souche indépendante, c'est exactement le contraire qui est observé. Nous en avons déduit que ce complexe ne renferme peut-être pas les mêmes enzymes dans les deux souches, ou bien les possède à des taux respectifs différents. Une partie de ces enzymes, faible chez S , serait détruite lors de la lyophilisation

Le métabolisme de l' AIA qui a pénétré dans la cellule est également différent dans les deux souches. Alors que la souche S forme deux types de conjugués, la souche MB n' en produit qu' un seul.

Lorsque la cellule reste constamment en présence d' AIA, la totalité de l' AIA pénétré est transformée en conjugués en 3 heures par la souche S. Après le même laps de temps, la souche MB, par contre, a conservé une portion non négligeable d' AIA libre. Si l' on admet, ce qui, à priori, n'est pas prouvé, que l' AIA endogène synthétisé par la cellule est soumis aux mêmes phénomènes de conjugaison, ce résultat ne concorde pas avec les taux d' AIA endogène que nous avons déterminés sous 4.2. En effet, nous aurions dû trouver alors une quantité plus élevée d' AIA dans les cellules MB que dans les cellules S. Nous avons vu que ces concentrations étaient semblables.

Deux conclusions peuvent en être tirées :

- ou bien l' AIA endogène ne suit pas les mêmes voies métaboliques que l' AIA fourni dans le milieu d' incubation.
- ou bien la différence dans la quantité d' AIA libre des deux souches s'annule peu à peu au cours du temps. Ce qui pourrait en effet être le cas, si l' on considère les résultats obtenus dans l'essai de "pulse" (4.4.2.3.). Dans ces conditions d' analyse cinétique, aucune différence dans le taux d' AIA libre n'est apparue.

Chapitre 5.

CONCLUSIONS GENERALES

L'étude du métabolisme de l'acide β-indolyl-acétique par des cellules dépendantes (S) ou indépendantes (MB) a permis de préciser les points suivants :

- les extraits bruts réalisés à partir de matériel frais ne possèdent pas d'activité auxines-oxydasique.
- une purification sur colonnes de Sephadex G 25 et G 100 permet de restaurer cette activité, en présence de cofacteurs.
  Les conditions optimales pour l'activité auxines-oxydasique ont été établies : AIA 10^{-4} M ; acide p-coumarique 5×10^{-5} M ; $MnCl_2$ 10^{-4} M ; pH 6.1. par du tampon phosphate (Sörensen), 1/15 M.
- la souche MB possède une activité auxines-oxydasique plus élevée que la souche S.
- le complexe auxines-oxydasique de la souche S a un poids moléculaire de 33'800 environ ; il est stable lorsque le matériel végétal est lyophilisé et conservé à froid. Par contre, le complexe de la souche MB (PM : 27'200 env.) est labile lors de la lyophilisation, ce qui se traduit par une diminution de son poids moléculaire global (11'400 env.)

- les deux souches forment les composés identifiés par Hinmann et Lang (1965) : l' oxindole-3-carbinol et le 3-méthylène-oxindole, dont le maximum d'absorption est à 248 nm. Un point isobestique apparaît à 264 nm ; ces résultats concordent avec ceux de Lescure (1970).

  La formation de ces composés a lieu pour un pH de 6.1, alors qu'à pH 5.0, aucune activité n'apparaît.

- la décarboxylation de l' AIA-1-^{14}C par des cellules intactes est plus forte pour MB que pour S.

- les deux souches ne laissent pas diffuser d'auxines-oxydase dans le milieu de culture.

- les produits résultant de cette décarboxylation se retrouvent dans le milieu d'incubation, mais sont absents à l'intérieur de la cellule.

- les produits de dégradation sont différents dans les deux souches cellulaires. Alors que pour la souche S, il ne reste que très peu d' AIA-1-^{14}C dans le milieu après 2 heures d'incubation, il en reste environ 40 fois plus pour MB. Cette différence est due principalement à des composés hydrosolubles.

- à l'intérieur de la cellule, l' AIA pénétré est rapidement soumis au phénomène de la conjugaison, à l'exclusion de toute autre évolution .

- alors que dans la souche S, deux types de conjugués sont formés, l' IAAsp et un AIA-glucoside, probablement du type AIA-myoinositol, les cellules MB ne forment que le conjugué glucosidique.

- l'enzyme responsable de la synthèse de l' IAAsp peut être induite par le 2,4-D (Venis 1972) ; cependant, l'absence de cet inducteur dans le milieu de culture de MB ne peut pas expliquer l'absence de synthèse d' IAAsp dans cette souche. Cette particularité semble donc bien être reliée au traitement mutagène.

- les conjugués, une fois formés, ne subissent pas d'évolution ultérieure et ne sont pas remétabolisés (turn-over), si l'on excepte une légère hydrolyse de l' AIA-glucoside chez S.

- la pénétration de l' AIA* n'est pas différente dans les deux souches.

- le taux en AIA endogène est semblable dans S et MB, et correspond à une molarité de 10^{-9} environ.

- les systèmes auxines-oxydasique semblent localisés dans le plasmalemme. Ils ne sont pas actifs en tant que tels dans le cytoplasme de la cellule intacte. Récemment, Epstein et Lavee (1975) ont également conclu à la présence d'enzymes de surface dégradant l' AIA-1-^{14}C fourni à des tissus de pommier cultivés "in vitro".

Enfin, pour conclure, nous pouvons dire que, bien que la souche MB possède plusieurs propriétés des autres cultures indépendantes, elle ne peut cependant pas être assimilée à un tissu tumoral ou à une souche anergiée. En effet, alors que ces dernières possèdent une teneur élevée en AIA endogène, la souche MB contient une quantité comparable à celle de la souche normale. Des trois hypothèses visant à expliquer l'indépendance citées sous 4.3.1.1., nous retiendrons la troisième d'entre elles, à savoir que l' auxine n'est pas un facteur de prolifération pour MB.

Cependant, la teneur en AIA lié endogène n'a pas été analysée, et peut-être qu'à ce niveau, une différence pourrait être mise en évidence. En effet, nous ne savons rien de l'évolution à long terme des conjugués, sur des périodes de plusieurs jours par exemple. L'étude de ces paramètres permettrait certainement de contribuer à élucider le problème de l'indépendance qui, à l'heure actuelle, comporte encore beaucoup d'inconnues.

Chapitre 6.

BIBLIOGRAPHIE

ANDREAE W.A., 1967 - Can. J. Bot. 45, 737 - 753.

ANDREAE W.A. et GOOD N.E., 1955 - Plant Physiol. 30, 380-382

ANDREAE W.A. et GOOD N.E., 1957 - Plant Physiol. 32, 566-572

ANDREAE W.A., ROBINSON J.E. et VAN YSSELSTEIN M.W.H. 1961 Plant Physiol. 36, 783-787.

ANDREAE W.A. et VAN YSSELSTEIN M.W.H., 1956 - Plant Physiol. 31, 235-240.

ANDREAE W.A. et VAN YSSELSTEIN M.W.H., 1960 - Plant Physiol. 35, 220-224.

ATHANASIADES-MERCANTON M., 1964 - Thèse Université de Lausanne, Faculté des Sciences.

BANDURSKI R.S. et SCHULZE A., 1974 - Plant Physiol. 54, 257-262.

BASU P.S. et TULI V., 1972 - Plant Physiol. 50, 507-509.

BERGMANN L., 1960 - J. Gen. Physiol. 43, 841-851

BERTHELOT A. et AMOUREUX G., 1938 - C.R. Acad. Sc. Paris 206, 537-540.

BERTILSSON L., ATKINSON A.J., ALTHAUS J.R., HARFAST A., LINDGREN J.E. et HOLMSTEDT B., 1972 - Analytical Chem. 44 (8), 1434-1438.

BLACK L.M., 1944 - Proc. Amer. Phil. Soc. 88, 132-144.

BLACK L.M., 1957 - J. Nat. Cancer Inst. 19, 663-685.

BRIDGES I.G., HILLMANN J.R. et WILKINS M.B., 1973 - Planta 115, 189-192.

BRIGGS W.R., STEVES T.A., SUSSEX J.M. et WETMORE R.H., 1955 - Plant Physiol. 30, 148-

BURNETT D. et AUDUS J., Phytochemistry 3, 395-415. (1964)

COLLET G., DUBOUCHET J. et PILET P.E., 1964 - Physiol. Vég. 2 (2), 157-194.

COPPING L.G. et STREET H.E., 1972 - Physiol. Plant. 26, 346-354.

CRONENBERG L., VILLE R. et PACHECO H., 1966 - Bull. Soc. Chim. Biol. 48, 833-836.

CZIHARZ H. et BRUCKER W., 1962 - Z. Acta. Biol. Med. Germ. 8 247-265.

DAVIES P.J. et GALSTON A.W., 1971 - Plant Physiol. 47, 435-441.

DETERMANN H., 1969 - in : Chromatographie sur gel. Masson éd. Paris, 1969, pp. 104.

DETERMANN H., 1969a- in : Chromatographie sur gel. Masson éd. Paris, pp. 54.

DETERMANN H., 1969b - ibid. pp. 55-56

DETERMANN H., 1969c - ibid. pp. 1-27

DOREE M., LEGUAY J.J. et TERRINE C., 1972 - Physiol. Vég. 10 (1) 115-131.

EHMANN A. et BANDURSKI R.S., 1974 - Carbohydrate Research 36, 1-12.

EPSTEIN E. et LAVEE S., 1975 - Plant and Cell Physiol. 16 (4), 553-561.

FOX R. et PURVES W.K., 1968 - Plant Physiol. 43, 454-456.

GALSTON A.W., 1956 - in : The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances. Proc. Symp. Wye College (London) R. L. Wain et F. Wightmann éds. Butterworths, 1956, pp. 219-233.

GANGULY T., GANGULY S.N., SIRCAR P.K. et SIRCAR S.M. 1974 Physiol. Plant 31, 330-332.

GASPAR T. et DINANT M., 1967 - Bull. Soc. Roy. Sc. Liège 36, 533-545.

GASPAR T. et PILET P.E., 1964 - C.R. Acad. Sc. Paris 259, 2280-2283.

GAUTHERET R.J., 1946 - C.R. Séanc. Soc. Biol. 140, 169-171.

GAUTHERET R.J., 1939 - C.R. Acad. Sc. Paris 208, 118-121.

GOOD N.E., ANDREAE W.A. et VAN YSSELSTEIN M.W.H., 1956 Plant Physiol. 31, 231-235.

GREENWOOD M.S., HILLMANN J.R., SHAW S. et WILKINS M.B., 1973 - Planta 109, 369-374.

HAMMAR C.G., HOLMSTEDT B., LINDGREN J.E. et THAM R., 1969 - Adv. in pharmacology and chemotherapy 7, 53-89.

HENSHAW G.G., JHA K.K., METHA A.R., SHAKESHAFT D.J. et STREET H.E., 1966 - J. Exp. Bot. 17, 362-377.

HERTEL R., 1974 - in : Membrane Transport in Plants. Zimmermann et Dainty éd., Springer Verlag, Berlin, 1974, pp. 457-461.

HERTEL R., THOMPSON K.St. et RUSSO V.E.A., 1972 - Planta 107 325-340.

HILDEBRANDT E.M. et RIKER A.J., 1947 - Amer. J. Bot. 34, 421-427.

HINMANN R.L. et LANG J., 1965 - Biochemistry 4 (1), 144-158.

HOUFF W.M.H., HINSWARK O.N., WELLER L.E. et SELL H.M., 1954 - J. Amer. Chem. Soc. 76, 5654-5656.

JEPSON J.B., 1958 - Biochem. J. 69 , 22-26

JERCKEL D. et MULLER R., 1951 - Naturwissenschaften 38 , 561-562.

KANDLER O., 1952 - Planta 40, 346-349.

KEGLEVIC D. et POKORNY M., 1969 - Biochem. J. 114, 827-832.

KLAMBT H., 1960 - Naturwissenschaften 47, 398-403.

KOGL K., HAAGEN-SMIT A.J. et ERXLEBEN H., 1934 - Z. physiol. Chem. 228, 90-94.

KOPCEWICZ J., EHMANN A. et BANDURSKI R.S., 1974 - Plant Physiol. 54, 846-851.

KULESCHA Z., 1952 - Rev. Gen. Bot. 59, 1-264.

KULESCHA Z., 1953 - C.R. Acad. Sc. Paris 236, 958-959.

KULESCHA Z., 1954 - C.R. Acad. Sc. Paris 238, 1060-1062

KULESCHA Z. et GAUTHERET R.J., 1948 - C.R. Acad. Sc. Paris 227, 292-294.

KUTACEK M. et KEFELI V.I., 1968 - in : Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. F. Wightman et G. Setterfield éds. Runge Press, Ottawa, 1968, pp. 127-152.

LAMPORT D.T.A. et NORTHCOTE D.H., 1960 - Nature 188 , 665-666.

LAVANCHY P., 1970 - Thèse Université de Lausanne, Faculté des Sciences.

LARSEN P., 1955 - in : Modern Methods of Plant Analysis. K. Paech et M.V. Tracey éd. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Göttingen, 1965, pp. 564-625.

LEOPOLD A.C. et PLUMMER T.H., 1961 - Plant Physiol. 36 589-592.

LESCURE A.M., 1963 - Physiol. Vég. 7 (3), 237-250.

LESCURE A.M., 1966 - Physiol. Vég. 4 (4), 365-378.

LESCURE A.M., 1970a - Thèse Université de Paris, Faculté des Sciences d' Orsay.

LESCURE A.M., 1970b - Bull. Soc. Chim. Biol. 52, 953-978.

LESCURE A.M., 1970c - Soc. Bot. fr. Mémoires 1970, 353-365.

LESCURE A.M. et PEAUD-LENOEL C., 1967 - C.R. Acad. Sc. Paris 265, 1803-1805.

LEXANDER K., 1953 - Physiol. Plant. 6, 406-411.

LIMASSET P. et GAUTHERET R.J., 1950 - C.R. Acad. Sc. Paris 230, 2043-2045.

LIORET C., 1963 - Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég. 9, 113-121.

LIORET C., 1966 - C.R. Soc. Biol. 160, 49-52.

LIPETZ J. et GALSTON A.W., 1959 - Amer. J. Bot. 46, 193-196.

LOCKE S.B., RIKER A.J. et DUGGAR B.M., 1939 - J. Agr. Res. 59, 535-539.

LOOMIS W.D. et BATAILLE J., 1966 - Phytochemistry 5, 423-438.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951 - J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Mac LACHLAN E.R. et WAYGOOD E.R., 1956 - Physiol. Plant 9, 321-330.

Mac NAIR H.M. et BONELLI E.J., 1969 - Basic gas chromatography. Vè. éd. Varian Aerograph éd., Walnut Creek, California, 1969.

MANN J.D. et JAWORSKI E.G., 1970 - Planta 92, 285-291

MEINS F. Jr., 1975 - Planta 122, 1-19.

MENAGE A. et MOREL G., 1964 - C.R. Acad. Sc. Paris 259, 4795-4796.

MENAGE A. et MOREL G., 1965 - ibid. 261, 2001-2002.

MENAGE A. et MOREL G., 1965 - C.R. Soc. Biol. 159, 561-564.

MOREL G., 1947 - C.R. Séanc. Soc. Biol. 141, 280-282.

MOREL G. et GAUTHERET R.J., 1955 - Rev. Gen. Bot. 62, 437-456.

MUIR R.M., 1970 - in : Plant Growth Substances 1970. D.J. Carr éd. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, pp. 96-101.

MUIR W.H., HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J., 1954 - Science 119, 877-878.

MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962 - Physiol. Plant. 15, 473-497.

NICKELL L.G., 1955 - Ann. Biol. 59 (ser III 31), 107-121.

OLNEY H.O., 1968 - Plant Physiol. 43, 293-302.

PHILLIPS H.J., 1973 - In : Tissue Cultures. Methods and applications. P.E. Kruse et M.K. Patterson eds. Academic Press, New-York and London, 1973, pp. 406.

PHIPPS J., 1965 - C.R. Acad. Sc. Paris 261, 3864-3867.

PILET P.E., 1957 - Rev. Gen. Bot. 64, 106-122.

PILET P.E., 1957 - Experientia 13, 35-40.

PILET P.E., 1958 - Rev. Gen. Bot. 65, 605-634.

PILET P.E., 1961 - in : Les Phytohormones de croissance. Masson éd. Paris, 1961, pp. 58-106.

PILET P.E., 1962 - Bull. Soc. Chim. Biol. 44, 875-886.

PILET P.E., 1963 - Physiol. Vég. 1, 171-190.

PILET P.E., 1964 - Phytochemistry 3, 617-621.

PILET P.E. et CHOLLET R., 1970 - C.R. Acad. Sc. Paris 271, 1675-1678.

PILET P.E. et DUBOUCHET J., 1962 - Rev. Gen. Bot. 69, 545-562.

PILET P.E. et GASPAR T., 1968 - Le catabolisme auxinique, Masson éd.,Paris 1968.

PILET P.E. et LAVANCHY P., 1969 - Physiol. Vég. 7, 19-29.

PILET P.E. et MATO M.C., 1967 - Ann. Physiol. Vég. 9, 369-375.

PILET P.E. et PERNET J.J., 1970 - Bull. Soc. Bot. suisse 80, 5-16.

PILET P.E. et SEVHONKIAN S., 1969 - Physiol. Vég. 7 (3), 325-333.

PILET P.E. ZRYD J.P. et LAVANCHY P., 1967 - Physiol. Vég. 5, 327-335.

PISKORNIK Z. et BANDURSKI R.S., 1972 - Plant Physiol. 50, 176-182.

RACK K., 1953 - Phytopath. Z. 21, 1-44.

RAY P.M., 1956 - Arch. Biochem. Biophys. 64, 193-216.

REKOSLAVSKAYA N.I., GAMBURG K.Z. et REIMERS F.E., 1974 - in : Biochemistry and Physiology of Plant Growth Regulators. Scheiber K., Schütte H.R. et Sembdner G., éds, Halle (Saale) 1974, pp. 333-343.

REY L., 1960 - Traité de lyophilisation. Hermann éd. Paris.

RIDDLE V.M. et MAZELIS M., 1964 - Nature 202, 391-392.

RIDDLE V.M. et MAZELIS M., 1965 - Plant Physiol. 40, 481-484.

RIVIER L. et PILET P.E., 1974 - Planta 120, 107-112.

ROLAND J.C. et PILET P.E., 1974 - Experientia 30, 441-451.

RONA J.P. et GRIGNON C., 1972 - C.R. Acad. Sc. Paris 274, 2975-2979.

De ROOP R.S., 1947 - Amer. J. Bot. 34, 53-62.

SCOTT T.K. et JACOBS W.P., 1964 - Colloque Int. Regulateurs Naturels de la croissance végétale, C.N.R.S. éd. Paris, 1964, pp. 457-474.

SCHIEWER U., KRIENKE H. et LIBBERT E., 1967 - Planta 76, 52-64.

SCHIEWER U. et LIBBERT E., 1965 - Planta 66, 377-380.

SCHLENK H. et GELLERMANN J.L., 1960 - Anal. Chem. 32, 1412-1414.

SCHNEIDER E.A. et WIGHTMAN F., 1974 - Ann. Rev. Plant. Physiol. 25, 487-513.

SEQUEIRA L. et MINEO L., 1966 - Plant Physiol. 41, 1200-1208.

SEVHONKIAN S., 1972 - Thèse Université de Lausanne, Faculté des Sciences.

SIMPKINS I, COLLIN H.A. et STREET H.E. 1970 - Physiol. Plant. 23, 385-396.

SIROIS J.C., 1966 - Plant Physiol. 41, 1308-1312.

SLONEKER J.H., 1972 - in : Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. VI. R.L. Whistler éd., Academic Press, 1972, pp. 20-24.

STAHL E., 1969a - in : Thin-layer chromatography. A laboratory handbook. IIème édition. E. Stahl éd. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1969, pp. 878.

STONIER T. et YONEDA Y., 1967 - Physiol. Plant. 20, 13-19.

STOWE B.B. et SCHILKE J.F., 1964 - Colloque Int. Régulateurs Naturels de la croissance végétale. C.N.R.S. éd. Paris. 1964, pp. 409-419.

STOWE B.B., VENDRELL M. et EPSTEIN E., 1968 - in : Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. F. Wightman et G. Setterfield, éds. Runge Press, Ottawa, 1968, pp. 173-182.

STRAUS J. et CAMPBELL W.A., 1963 - Life Sciences 1, 50-62.

STUART R. et STREET H.E., 1969 - J. Exp. Bot. 20 (64), 556-571.

STUART R. et STREET H.E., 1971 - J. Exp. Bot. 22, 96-106.

STREET H.E., 1973 - in : Plant tissue and cell culture. Botanical monographs Vol. 11. H.E. Street ed. Blackwell Scientific publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1973.

SUDI J., 1964 - Nature 201, 1009-1010.

SUDI J., 1966 - New Phytologist 65, 9-21.

SUNDERLAND N., 1966 - Annals of Botany, N.S. 30 (118), 253-268.

THURMANN D.A. et STREET H.E., 1962 - J. Exp. Bot. 13, 369-375.

TOMASZEWSKI M., 1959 - Bull. Acad. Sc. Pol., Ser. Sc. Biol. 7 127-130.

TOMASZEWSKI M., 1964 - in : Colloque Int. Régulateurs Naturels de la croissance végétale, C.N.R.S. éd. Paris, 1964, pp. 335-351.

TULI V. et MOYED H.S., 1967 - Plant Physiol. 42, 425-430.

UEDA M. et BANDURSKI R. S., 1969 - Plant Physiol 44, 1175-1181.

UEDA M., EHMANN A. et BANDURSKI R.S., 1970 - Plant Physiol. 46, 715-719.

VAN DER MAST C.A., 1970a - Acta Bot. Neerl. 19, 553-566.

VAN DER MAST C.A., 1970b - Acta Bot. Neerl. 19, 727-736.

VAN SUMERE C.F., PARMENTIER F. et VAN POUCKE M., 1959 - Naturwissenschaften 46, 668-668, short comm.

VENIS M.A., 1972 - Plant Physiol. 49 (1), 24-27

WAGENKNECHT A.C. et BURRIS R.H., 1950 - Arch. Biochem. Biophys. 25, 30-53.

WAYGOOD E.R. et Mac LACHLAN G.A., 1956 - Physiol. Plant. 9 607-617.

WEAVER G.M. et JACKSON H.O., 1963 - Can. J. Bot. 41, 1405-1418.

WICHNER S., 1967 - in : Wachstumregulatoren bei Pflanzen. Internationale Vortragstagung, Rostock-Kühlungsborn. Fischer ver. Jena éd. Ostseedruck, Zweigwerk-Greifswald 1967, pp. 443-444.

WISHOLM C.M., 1972 - Stain Technology 47 (4), 189-194.

WHITE P.R., 1944 - Cancer Res. 4, 791-794.

WHITE P.R., 1951 - Quart. Rev. Biol. 26, 1-16.

YAMAOKA T., HAYASHI T. et SATO S., 1969 - J. Fac. Sc. Tokyo III 10 (8), 117-127.

YONEDA Y. et STONIER T., 1967 - Plant Physiol. 42, 1017-1020.

ZENK M.H., 1961 - Nature 191, 493-494.

ZENK M.H., 1964 - Colloque Int. Régulateurs Naturels de la croissance végétale, C.N.R.S. éd. Paris, 1964, 223, 241-249.

ZENK M.H. et MULLER G., 1963 - Nature 200, 761-763.

ZILLIG W. et HOLZEL H., 1958 - Hoppe-Seylers's Z. Physiol. Chem. 312, 140-143.

ZRYD J.P., 1967 - Thèse Université de Lausanne, Faculté des Sciences.

ZRYD J.P. et PILET P.E., 1973 - Plant Science Letters 1, 479-482.